



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

.....
ปริญญา

.....
โรคพืช

.....
สาขา

.....
โรคพืช

.....
ภาควิชา

เรื่อง การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้คะน้าเกิด
ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช

Systemic Resistance Induction of Kale Against Disease and Insect Pest

Bacterial Antagonist, *Pseudomonas fluorescens* SP007s

نامผู้วิจัย นางสาวนลินา เหมสนิท

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... อาจารย์สุพจน์ กาเข้ม, วท.ค.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... อาจารย์จรรูวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, วท.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(..... รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(..... รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสันทิ มทาวิตยาสัยเกษตรศาสตร

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้กะหล่ำปลีเกิดภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช

Systemic Resistance Induction of Kale Against Disease and Insect Pest by
Bacterial Antagonist, *Pseudomonas fluorescens* SP007s

โดย

นางสาวนลินา เหมสนิท

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นลินา เหมสนิท 2554: การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักน้ำให้คะน้ำ
เกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช
ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D. 121 หน้า

เชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช (PGPR) สายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักน้ำให้คะน้ำต้านทานต่อโรค (โรคเน่าดำเกิดจาก *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) และแมลงศัตรูพืช (หนอนใยผัก *Plutella xylostella*) ทั้งในระดับสัณฐาน และชีวเคมี ภายใต้สภาพเรือนทดลอง โดยเมื่อใช้กลูกลีค และ ฟันไบคัล 3 ครั้ง ที่อายุ 14 21 และ 28 วัน ก่อนปลูกเชื้อโรค สามารถกระตุ้นให้พืชผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase : SOD ($33 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein) และเกิดการสะสม glucosinolate เพิ่มขึ้น ($22.16 \mu\text{mol/g}$) ส่งผลให้ความรุนแรงของโรคเน่าดำลดลง รวมทั้งหนอนใยผักไม่กินคะน้ำที่พันเชื้อ SP007s และมีการตายเกิดขึ้น จึงได้นำเชื้อ PGPR สายพันธุ์นี้พัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ผลิตภัณฑ์เป็นการค้า ด้วยการผสมสารเสริมประสิทธิภาพหลายชนิดที่อัตราส่วนแตกต่างกัน จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปชนิดใหม่ชื่อ KUwin/Gap SP007s และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่เพื่อขยายพันธุ์ SP007s ให้ได้ปริมาณมาก ชื่อ SPMP medium (กากถั่วเหลือง:มันฝรั่ง = 1: 0.5 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ต้มแล้วกรอง) โดยผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่มีส่วนประกอบของ kaolin : lactose : alkylamine ethoxylates : SiO_2 : CaSO_3 : CMC : FeSO_4 = 70: 14: 8: 5:1:1:1 นน./นน. ที่ผสมเชื้อ SP007s (3×10^{13} cfu/ml) อัตรา 20 มิลลิลิตร/ ส่วนผสมผลิตภัณฑ์หนัก 1 กิโลกรัม

การตรวจสอบยืนยันประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ชื่อ KUwin/Gap SP007s (เชื้อปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ในสูตรผง kaolin) ที่อายุ 6 เดือน หุ้มด้วยพลาสติกเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง ($29 \pm 3^\circ\text{C}$) ในการควบคุมโรคและแมลงของคะน้ำภายใต้เรือนทดลองและสภาพไร่ ณ แหล่งผลิต จ.อ่างทอง พบว่า SP007s ในผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่นี้ เมื่อใช้กลูกลีค (1×10^6 cfu/ml จำนวน 1 กรัม/เมล็ดหนัก 1 กก.) และฟันไบ 3 ครั้ง (1×10^8 cfu/ml) เมื่อพืชอายุ 14 21 และ 28 วัน มีศักยภาพกระตุ้นให้พืชผลิตสารต้านทานศัตรูพืชสะสมมากขึ้น คือ superoxide dismutase: SOD (การทดลองในโรงเรือน ; และในไร่ด้านโรคและแมลง มี SOD เพิ่มขึ้น 1.8 และ 1.7 ; และ 2 เท่า ตามลำดับ) และ glucosinolate (การทดลองในโรงเรือน ; และในไร่ด้านโรคและแมลงเพิ่มขึ้น 3.5 และ 3.1 ; และ 3.6 เท่า ตามลำดับ) ซึ่งสัมพันธ์กับการระบาดของทั้งโรคและแมลงศัตรูพืชที่ลดลง ได้แก่ โรคเน่าดำ (ลดลง 89% ในเรือนทดลอง) และโรคที่ระบาดตามธรรมชาติในสภาพไร่ (โรคเน่าดำ; โรคใบจุดเกิดจาก *Alternaria brassicicola* โรคเน่าและ จาก *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และโรคราน้ำค้าง จาก *Peronospora parasitica* มี area under disease progress curve: AUDPC ลดลง 96 96 99 และ 93% ตามลำดับ); และหนอนใยผัก (ตาย 60% ในเรือนทดลอง); และจำนวนแมลงในสภาพไร่ ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) ลดลง 66 45 และ 55% ตามลำดับ ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คือ ผลิตภัณฑ์ชีวภาพชนิดใหม่ ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งทั้งโรคและแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ตลอดจนการกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ SOD และสาร glucosinolate เพิ่มขึ้น ซึ่งจัดเป็นรายงานแรกของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nalina Hemsanit 2011: Systemic Resistance Induction of Kale Against Disease and Insect Pest by Bacterial Antagonist, *Pseudomonas fluorescens* SP007s. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 121 pages.

Systemic resistance induction of kale against black rot (caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* : XCC) and diamondback moth (*Plutella xylostella*) by plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* SP007s at morphological and biochemical levels was studied. Strain SP007s induced superoxide dismutase (SOD) production ($33 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} protein) and increased glucosinolate accumulation ($22.16 \mu\text{mol/g}$) in the plant when applied to seed and seedling prior to XCC inoculation that resulted in decreased disease severity under greenhouse experiments. Plants treated with this SP007s strain were also affected feeding decrease and mortality of diamondback moth. To increase efficiency for commercial production, a formulation of SP007s was developed with varied carrier and supporter substrate combination. A new product named KUwin/Gap SP007s and a new medium for SP007s biomass production (named SPMP medium by soybean meal: potato = 1:0.5 g/L distilled H₂O boiled extract) were developed with supporter ratio of kaolin : lactose : alkylamine ethoxylate : SiO₂ : CaSO₃ : CMC : FeSO₄ = 70: 14: 8: 5:1:1:1 w/w then mixed with 20 ml (3×10^{13} cfu/ml SP007s)/kg supporter.

The efficiency of a new product named KUwin/Gap SP007s (kaolin-based formulation of *P. fluorescens* SP007s antagonist) with 6-month-shelflife in a plastic wrap storage at room temperature (29 ± 3 °C) in protecting kale against diseases and insect pests was demonstrated at Angthong farm production. The SP007s in a new product induced plant resistance when applied with seed treatment (1×10^6 cfu/ml) with 1 g/ 1 kg seed and 3-foliar sprays (1×10^8 cfu/ml) at 14, 21, and 28-day-old plants, that was correlatively associated with potentiated superoxide dismutase (SOD) production (greenhouse; and field experiments for disease and insect with 1.8 and 1.7; and 2 fold increase respectively) and upregulation of glucosinolate deposition (3.5 and 3.1; and 3.6 fold increase respectively) against diseases (89 and 96 % reduction of black rot in greenhouse and field respectively; and other field epidemic diseases including *Alternaria brassicicola* caused leaf spot, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* –soft rot, and *Peronospora parasitica* – downy mildew with 96, 99, and 93% reduction of AUDPC respectively) and insect pests (60% mortality of diamondback moth in greenhouse ; and reduction in number of diamondback moth, common cutworm -*Spodoptera litura*, and flea beetle-*Phyllotreta sinuata* under field experiment = 66, 45 and 55% respectively). The bioproduct developed, and antimicrobial and insecticidal activities, including upregulation of SOD and glucosinolate deposition in this study are the first report for *P. fluorescens* SP007s.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุกฤดี ประเทืองวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านวิชาการ แนวความคิดในการทำงานวิจัย ตลอดจนการใช้ชีวิต และการอยู่ร่วมกันในสังคม พร้อมทั้งแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาระหว่างการศึกษาดำเนินงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุพจน์ การัมย์ และ ดร.จารุวัฒน์ เกาธรรมพิทักษ์ กรรมการร่วม ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้คำปรึกษาในทุกเรื่องตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ และ ดร.วันเพ็ญ ศรีทองชัย ที่ให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ชัยสิทธิ์ ปรีชา ดร.ดุสิต อธิณัฐณ์ ดร.ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ นางสาววิลาวรรณ เชื้อบุญ นางสาวติยากร ฉัตรนภารัตน์ นางสาวพรพิมล จันทร์อ่อน นางสาวพิชามญช์ เตชะดี และคุณวิภา สิริธนบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำ และสอนเทคนิควิธีการตลอดการวิจัย และเจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกท่าน ที่เอื้ออำนวยความสะดวก และความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ด้วยดี ขอขอบคุณนางสาววราภรณ์ ภูักดีพันธ์ นางสาวสุนันทนา นุรักษ์ดี และนางสาววรรณุช ติละมัน ที่เป็นเพื่อนที่ดีที่คอยช่วยเหลือ และดูแลกันตลอดมา ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ชาวโรคพืชทุกคนที่เป็นกำลังใจในการเรียนและการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิตสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในเรื่องนี้

ขอขอบคุณบริษัทแก๊พอินดัสตรีย์ คุณบรรยง ประเทืองวงศ์ คุณศุภชัย บุศปพงศ์ กรรมการผู้บริหารบริษัทแก๊พอินดัสตรีย์ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และสถานที่วิจัยวิทยานิพนธ์ และอาจารย์สันติ สุวรรณรังษี ผู้จัดการโรงงาน ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิจัยให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

ที่สำคัญยิ่งประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่ครอบครัว คุณพ่อ นพดล คุณแม่ หรือเปี๊ยะ นางสาวอริญา เหมสนิท ครอบครัวหมะหมัด และครอบครัวสันติพิทักษ์ ตลอดจนครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้มา ณ ปัจจุบัน

นลินา เหมสนิท

มีนาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	46
ผล	46
วิจารณ์	85
สรุป	93
ข้อเสนอแนะ	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	109
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับการพิจารณาความรุนแรงของโรคเน่าดำ	24
2	สารพาที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s	38
3	ส่วนประกอบระหว่างสารพา สารอาหาร และสารเสริมประสิทธิภาพ	40
4	คุณสมบัติพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> สาเหตุโรคเน่าดำคะน้ำ	50
5	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Pseudomonas fluorescens</i> SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นคะน้ำ และการควบคุมโรคเน่าดำ	56
6	ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนใยผักด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ภายใต้ห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง	57
7	การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ในอาหารเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์	60
8	อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ในอาหาร Soybean Potato-Modified for <i>Pseudomonas</i> SP007s medium	61
9	ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ <i>P. fluorescens</i> SP007s ในอาหาร SPMP	62
10	ประสิทธิภาพสารพาแต่ละชนิดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s	65
11	ประสิทธิภาพสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน	66
12	อัตราส่วนระหว่างสารอาหารและสารพา Kaolin : deshecofix : SiO_2 : CaCO_3 : lactose : FeSO_4	67
13	เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ระหว่างชนิดใหม่คือ KUwin/Gap SP007s และ ISR-P® (ชนิดเก่า)	68
14	ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	70
15	ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพไร่	71
16	ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงศัตรูคะน้ำทดสอบในสภาพไร่	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ทุก 7 วันในคะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	76
18	กิจกรรมสาร glucosinolate หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	78
19	กิจกรรมสาร glucosinolate หลังปล่อยหนอนใยผักในสภาพเรือนทดลอง	79
20	กิจกรรมสาร glucosinolate ชุดควบคุม ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	80
21	กิจกรรมสาร glucosinolate ทุก 7 วันในคะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	81
22	กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutate (SOD) ทุก 7 วัน ในคะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพไร่	83
23	กิจกรรมของสาร glucosinolate ทุก 7 วัน ในคะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพไร่	84

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ glucosinolate ซึ่งประกอบด้วย กำมะถันกลุ่ม sulfhydryl group, -SH และหมู่ซัลโฟ sulfo group ที่โซ่ข้าง R 17
2	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสลายสาร glucosinolate มีเอนไซม์ myrosinase เปลี่ยนสาร glucosinolate ให้อยู่ในรูป isothiocyanate และ thiocyanate 18
3	ภาพผังการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Pseudomonas fluorescens</i> SP007s ในยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ด้วยวิธี agar diffusion 31
4	ลักษณะอาการโรคเน่าดำที่ลูกกลามของเชื้อจากขอบใบทำให้ใบเป็นสีเหลือง และลูกกลามเข้าเส้นกลางใบทำให้ท่อลำเลียงน้ำและลำเลียงอาหารของพืชมีสีดำ (ก) โดยเชื้อสาเหตุ <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ที่แยกจากตัวอย่างมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ มันวาว บนอาหาร NGA (ข) 51
5	ผลผลิต PCR ของ 16S rDNA โดย primer จำเพาะขนาด 550 bp บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ช่องที่ M = 1 kb ladder ช่องที่ 1-2 = <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> สายพันธุ์ Bra 17 และ Brp 13 51
6	หนอนใยผัก <i>Plutella xylostella</i> มีลักษณะของไข่หนอนมีสีเขียวใสวางไข่แบบฟองเดี่ยว ๆ (ก) เจริญเป็นตัวหนอน ซึ่งกินคะน้าเป็นอาหาร (ข) เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้จะสร้างเส้นใยปกคลุมตัวหนอนสีขาว (ค) และเจริญเป็นผีเสื้อกลางคืนตัวเต็มวัย (ง) 52
7	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ลักษณะโคโลนีขาวครีม แบบขอบเรียบ เหลือบแสง ที่เจริญบนอาหาร NGA (ก) สามารถสร้างสารเรืองแสงได้บนอาหาร King medium B (ข) และสร้างสาร secondary metabolite ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ (ค) 55
8	ชีพจักรของเชื้อ <i>P. fluorescens</i> SP007s ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SPMP (อาหารดัดแปลงชนิดใหม่) เปรียบเทียบ MS (อาหารดัดแปลง) (ชัยสิทธิ์, 2549) NGB (อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป) KB (อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ <i>P. fluorescens</i>) และ sterile water (เลี้ยงในน้ำกลั่น) 63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
9	กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในค่าน้ำหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค เน่าดำทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	74
10	กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังปล่อยหนอนไขผักทดสอบ ในสภาพเรือนทดลอง	75
11	กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ในชุดที่ ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคและไม่ถูกหนอนเข้าทำลายทดสอบในสภาพเรือนทดลอง	75
12	โคอะแกรมแสดงกลไกการเกิด Superoxide dismutase และ glucosinolate หลังจากปลูก โรคและถูกหนอนเข้าทำลายในพืชผ่านการคลุกเมล็ดร่วมกับการ พ่นใบ 3 ครั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s	92
ภาพผนวกที่		
1	โครมาโตแกรมของสาร glucosinolate	116
2	โครมาโตแกรมการฉีดตัวอย่างค่าน้ำที่มีสาร glucosinolate	116
3	กราฟและสมการ standard curve ของสาร sinigrin	117
4	กราฟและสมการ standard curve ของสาร glucoiberin	118
5	ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s และ ISR-P® ผสมน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ	118
6	อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณที่เตรียมไว้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s ตามรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3	119

การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้กะน้าเกิด ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช

Systemic Resistance Induction of Kale Against Disease and Insect Pest by Bacterial Antagonist, *Pseudomonas fluorescens* SP007s

คำนำ

การผลิตกะน้าจะประสบปัญหาศัตรูพืชระบาดทั้งโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคเน่าดำหรือโรคขอบใบทองที่เกิดจาก *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ซึ่งทำความเสียหายอย่างร้ายแรงเป็นประจำในช่วงฤดูปลูกที่มีความชื้น และอุณหภูมิสูง ตลอดจนการระบาดของแมลง โดยเฉพาะหนอนใยผัก (diamondback moth , *Plutella xylostella* L.) มักพบควบคู่กับโรคดังกล่าว (Prathuangwong, 2009) โดยกะน้าถูกหนอนเข้าทำลาย และบาดแผลที่เกิดขึ้นจะเป็นช่องทางสำคัญให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืช หากโรคและแมลงที่เกี่ยวข้องไม่ได้รับการควบคุม หรือป้องกันกำจัดอย่างเหมาะสมจะทำให้ผลผลิตเสียหายสูงถึง 58 % และเป็นปัญหาต่อการผลิตอย่างกว้างขวาง การควบคุมโรค และแมลงศัตรูพืชของกะน้ายังคงใช้สารเคมีตามตารางกำหนดโดยไม่คำนึงถึงสถานการณ์จริงของการระบาดศัตรูพืช และปัญหาการดื้อต่อสารเคมีที่ติดตามมา จึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้วิธีการควบคุมโรคทางเลือกอื่นเข้าร่วมหรือทดแทน ซึ่งการควบคุมโรคโดยชีววิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ได้รับความสนใจ และประสบความสำเร็จในระดับที่ดี (สุตฤดี และคณะ, 2550)

โดย Prathuangwong (2009) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่คัดเลือกจากดินบริเวณรอบรากกะน้าดอกรามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้อย่างกว้างขวางครอบคลุมทุกกลุ่มเชื้อโรคที่สำคัญ ไม่ว่าจะเป็นโรคที่ระบบราก โรคทางใบ และโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s มีคุณสมบัติในการสร้างสาร secondary metabolites ขับยั้งเชื้อโรค ตลอดจนเจริญแข่งขันแก่งแย่งในการใช้ธาตุอาหารกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กระตุ้นให้ต้นพืชผลิตฮอร์โมนการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น และส่งเสริมให้ต้นพืชสมบูรณ์แข็งแรง สามารถรอดพ้นวิกฤติจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคในระยะต้นกล้าได้ดี นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ยังสามารถนำไปใช้ป้องกันโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญได้หลายชนิด (พืชตระกูลกะหล่ำ ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองฝักสด และข้าว) และคงประสิทธิภาพสม่ำเสมอในทุกพื้นที่ที่ทดลอง และสามารถเข้าร่วมในระบบการปลูกพืช และการจัดการ

ศัตรูพืชแบบต่าง ๆ ได้ดี ยิ่งไปกว่านั้นได้มีการตรวจสอบแล้วไม่พบยีน *hrcN* ในเชื้อ SP007s ซึ่งจำเป็นต่อการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรีย ตลอดจนสายพันธุ์นี้ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเซลล์ของพืชตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response) ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่า *P. fluorescens* SP007s ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (วิลาวรรณ์ และคณะ, 2549; ดิยากร และ สุคติ, 2550; วิลาวรรณ์ และ สุคติ, 2550; วิลาวรรณ์ และ คณะ, 2550; สุคติ และ คณะ, 2550; วิลาวรรณ์ และ สุคติ, 2551; Prathuangwong *et al.*, 2009a; Prathuangwong *et al.*, 2009b; Prathuangwong *et al.*, 2009c) ซึ่งคุณสมบัติที่กล่าวมาทั้งหมดมีความจำเป็นต่อการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ดีในการใช้ควบคุมโรค และปรับปรุงผลผลิตพืช และเป็นคุณสมบัติที่โดดเด่นของเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* SP007s ที่มี การศึกษาครอบคลุมในเชิงลึกถึงกลไกในการควบคุมโรคของเชื้อสายพันธุ์นี้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาวิจัยยืนยันการใช้เชื้อนี้จะกระตุ้นให้กะหล่ำมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของหนอนใยผัก ทั้งนี้กลไกสำคัญของการชักนำให้พืชต้านทานโรค และ/หรือ แมลง จะเกี่ยวข้องกับการสะสม defense-related enzymes หลายชนิด (Buensanteai *et al.*, 2008) แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าเชื้อนี้จะกระตุ้นให้พืชสร้าง superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองของพืช เพื่อการปกป้องจากความเครียดเนื่องจากสิ่งมีชีวิต (โรค และ แมลง) และสภาพแวดล้อม และที่สำคัญมีรายงานว่าพืชในตระกูลกะหล่ำจะมีการผลิตและปลดปล่อยสาร glucosinolate ซึ่งสามารถยับยั้งแมลงศัตรูพืช และ โรคพืชได้ (Craig and Sam, 2002) หากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพชักนำให้กะหล่ำสร้างสาร glucosinolate เพิ่มขึ้น ก็อาจมีแนวโน้มควบคุมการเข้าทำลายจากหนอนใยผักซึ่งยากต่อการควบคุมด้วยสารเคมี และมีการดูดต่อสารฆ่าแมลงหลายชนิดได้

การควบคุมโรคโดยชีววิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ได้รับความสนใจ และประสบความสำเร็จในระดับดี และได้มีการศึกษาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จที่สามารถคงประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เมื่อนำไปใช้ในสภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s เดิมที่พัฒนาในรูปผลิตภัณฑ์ ISR-P[®] มีรายงานการนำไปใช้ในสภาพไร่เพื่อควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด (Prathuangwong *et al.*, 2007) ซึ่งการสร้างผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะต้องมีการเพิ่มปริมาณเซลล์ตั้งต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และนำเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว มาผสมเข้ากับสารพาหะที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพเซลล์และคงประสิทธิภาพเซลล์แบคทีเรีย SP007s อย่างไรก็ตามสูตรผลิตภัณฑ์เชื้อ ISR-P[®] ยังคงมีต้นทุนการผลิตที่สูง งานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาต่อยอดเพื่อปรับปรุงการผลิตผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จที่มีต้นทุนต่ำ โดยนำเอาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเข้าร่วมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่จะช่วยให้

เกษตรกรสนใจการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมากขึ้น ซึ่งช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์และต้นทุนการผลิตพืชได้ในที่สุด



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ในการกระตุ้นให้พืชสร้างสาร superoxide dismutase (SOD) และ สาร glucosinolate ที่มีผลยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคน้ำดำ (*X. campestris* pv. *campestris*) และหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ทั้งในสภาพเรือนทดลอง และในสภาพไร่
2. พัฒนาสูตรสำเร็จของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ที่มีประสิทธิภาพ และราคาถูกโดยพัฒนาจากวัสดุเหลือใช้ และเกษตรกรสามารถผลิตใช้ได้ง่ายด้วยตนเอง

การตรวจเอกสาร

คะน้า

คะน้า (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) เป็นผักที่แต่ละประเทศมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป คะน้าเป็นผักที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยกรีกโบราณและโรมัน โดยใช้คะน้าเป็นอาหารมาตั้งแต่ 200 ปีก่อนคริสต์ศักราช มีถิ่นกำเนิดมาจากแถบ Mediterranean นำไปสู่ประเทศจีน อินเดีย ไทย ได้หัวนมมาเลเซีย จนได้รับความนิยมเป็นเวลานาน (Rubatzky and Yamaguchi, 1997) คะน้าเป็นพืชฤดูเดียว (ไฉน, 2542) พบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง (nutrition values) ที่จำเป็นต่อร่างกายโดยส่วนที่กินได้ 100 กรัม จะมีวิตามินเอ 7,540 IU วิตามินซี 115 มิลลิกรัม แคลเซียม 62 มิลลิกรัม เหล็ก 2.2 มิลลิกรัม (Siemonsma and Piluek, 1994) มีการศึกษาพบว่าใบคะน้ามีแคลเซียมสูงมาก ร่างกายสามารถดูดซึมแคลเซียมจากคะน้าได้ไม่น้อยกว่าแคลเซียมจากนม พบเบต้าแคโรทีน วิตามินซี และเกลือแร่อยู่เป็นจำนวนมาก

พันธุ์คะน้า

ปัจจุบันพันธุ์คะน้าที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีอยู่ 3 ประเภทคือ (เกษม, 2524)

1. คะน้าใบกลม มีลักษณะใบกว้างใหญ่ ปล้องสั้น ปลายใบมนและผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อย พันธุ์ฝางเบอร์ 1
2. คะน้าใบแหลม มีลักษณะใบแคบกว่าพันธุ์ใบกลม ปลายใบแหลม ขั้วห่าง
3. คะน้ายอดหรือก้าน มีลักษณะใบเหมือนกับคะน้าใบแหลม แต่จำนวนใบต่อดันมีน้อยกว่า ปล้องยาวกว่า พันธุ์แม่โจ้ 1

สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม

คะน้าเป็นผักที่สามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิดที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงมีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของดินอยู่ระหว่าง 5.5 - 6.8 และมีความชื้นในดินสูงสม่ำเสมอ ความชื้นในดินประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ต้องการแสงแดดเต็มที่ คะน้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิเฉลี่ย 20 องศาเซลเซียส แต่คะน้าก็สามารถทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ดี และให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจใน

สภาพอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากได้เปรียบกว่าผักตระกูลกะหล่ำอย่างอื่นที่ไม่จำเป็นต้องผ่านการห่อหุ้มหรือออกดอกก่อนการเก็บเกี่ยว (ไฉน, 2542)

การปลูกและดูแลรักษาคะน้า

การปลูกคะน้าซึ่งสามารถปลูกได้ตลอดปีแต่ผลผลิตที่ได้จะแตกต่างกัน ช่วงปลูกเดือนมิถุนายนให้ผลผลิตสูงสุด รองลงมาคือ พฤศจิกายน เดือนตุลาคม เดือนกรกฎาคม และช่วงเดือนที่ให้ผลผลิตต่ำสุดคือ เดือนมีนาคม เนื่องจากเป็นช่วงที่ความชื้นในดินและอากาศต่ำ และยังมีแมลงชนิดหนอนใยฝักระบาดอีกด้วย เนื่องจากคะน้าเป็นผักรากตื้นจึงควรขุดดินให้ลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร ตากดินทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน แล้วนำปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมักที่สลายตัวดีแล้วมาใส่คลุกเคล้าให้เข้ากับดิน ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงสภาพทางกายภาพและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ถ้าดินเป็นกรดควรใส่ปูนขาวเพื่อปรับปรุงดินให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม การเพาะปลูกหลังจากเตรียมดินโดยย่นหน้าดินให้ละเอียดแล้ว นิยมหว่านเมล็ดลงบนแปลงปลูกโดยตรงมากกว่าการย้ายกล้า หว่านเมล็ดให้กระจายทั่วทั้งผิวนแปลง ให้เมล็ดห่างกันประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใช้ดินผสมหรือปุ๋ยคอกที่สลายตัวดีแล้วหว่านกลบเมล็ดให้หนาประมาณ 0.6-1 เซนติเมตร คลุมด้วยฟางหรือหญ้าแห้งสะอาดบาง ๆ รดน้ำให้ทั่วถึงและสม่ำเสมอตั้งกล้าจะงอกภายใน 7 วันหลังจากคะน้างอกแล้วประมาณ 20 วัน หรือต้นสูงประมาณ 10 เซนติเมตร ให้เริ่มทำการถอนแยกครั้งแรก โดยเลือกถอนต้นที่ไม่สมบูรณ์ออก ให้เหลือระยะห่างระหว่างต้นไว้ประมาณ 10 เซนติเมตร และเมื่อคะน้ามีอายุได้ประมาณ 30 วัน จึงทำการถอนแยกครั้งที่ 2 โดยให้เหลือระยะห่างระหว่างต้น 20 เซนติเมตร ในการถอนแยกคะน้าแต่ละครั้งควรทำการกำจัดวัชพืชไปในตัวด้วย และระยะปลูก ที่เหมาะสมคือ 20x25 หรือ 25x25 เซนติเมตร ระบบการปลูก ที่นิยมมี 2 ระบบคือ 1. การปลูกแบบร่องสวนหรือแบบร่องจีน ส่วนมากเป็นพื้นที่ลุ่มแถวชานเมืองกรุงเทพฯ ปกติร่องสวนจะกว้างประมาณ 5-6 เมตร ความยาวไม่มีกำหนดหรือตามความยาวของพื้นที่ ขุดดินระหว่างร่องกว้างประมาณ 3-4 เมตร นำดินขึ้นมาใส่บนสันร่องเพื่อป้องกันน้ำท่วม 2. การปลูกแบบยกแปลงปลูก ปกติแปลงที่ใช้ปลูกจะกว้าง 1 เมตร ยาว 10 เมตร ความสูงแปลง 10-15 เซนติเมตร ทางเดิน 50 เซนติเมตร ซึ่งสะดวกต่อการปฏิบัติรักษาเป็นอย่างมาก (ประยูรและอาสา, 2528)

การดูแลรักษา เมื่อหว่านหรือหยอดเมล็ดเรียบร้อยแล้ว กลบเมล็ดด้วยดินดีหรือปุ๋ยอินทรีย์หนาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร คลุมด้วยฟางข้าวหรือหญ้าแห้ง เพื่อรักษาความชุ่มชื้นและการป้องกันน้ำที่ระเหยกับหน้าดินและเมล็ดโดยตรงเสร็จแล้วรดน้ำให้ชุ่ม การให้น้ำพบว่าคะน้าเป็น

พืชที่ต้องการน้ำอย่างเพียงพอและสม่ำเสมอ เพราะต้นคะน้ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การปลูกคะน้าจึงต้องปลูกในแหล่งที่มีน้ำเพียงพอตลอดฤดูปลูก หากคะน้าขาดน้ำจะทำให้ชะงักการเจริญเติบโตและคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่เมล็ดเริ่มงอกยิ่งขาดน้ำไม่ได้เลย วิธีการให้น้ำคะน้าโดยใช้บัวฝอย หรือใช้เครื่องฉีดฝอยฉีดให้ทั่วและชุ่ม ให้น้ำคะน้า วันละ 2 เวลา คือ เช้าและเย็น การใส่ปุ๋ย เนื่องจากคะน้าเป็นผักกินใบและลำต้น ดังนั้นจึงควรใส่ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจนสูง สัดส่วนของธาตุอาหารในปุ๋ยที่ใช้คือ N:P:K เท่ากับ 2:1:1 เช่น ปุ๋ยสูตร 12-8-8 หรือ 20-11-11 ในอัตราประมาณ 100 กิโลกรัมต่อไร่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน และปริมาณปุ๋ยคอกที่ใช้ โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ๆ ละเท่า ๆ กัน คือ ใส่หลังจากการถอนแยกครั้งแรก และหลังจากถอนแยกครั้งที่สอง อย่างไรก็ตามหากสังเกตเห็นว่าผักที่ปลูกไม่ค่อยเจริญเติบโตเท่าที่ควร อาจจะใส่ปุ๋ยบำรุงเพิ่มเติม เช่น ปุ๋ยยูเรีย ปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรท โดยให้ทางรากหรือละลายน้ำในอัตราประมาณ 3-4 ช้อนแกงต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นทางใบ หมั่นพรวนดินและกำจัดวัชพืช ควรทำพร้อมๆ กับการถอนแยก และต้องระวังไม่ให้รากและใบของคะน้าได้รับความกระทบกระเทือน คะน้าที่ปลูกในประเทศไทยมีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 45-55 วัน หลังปลูก ซึ่งเป็นระยะที่คะน้าโตเต็มที่ คะน้าอายุ 45 วันเป็นระยะที่ตลาดมีความต้องการมาก แต่คะน้าที่มีอายุ 50-55 วันเป็นระยะที่เก็บเกี่ยวได้น้ำหนักมากกว่า โดยใช้มีดตัดให้ชิดโคนต้น (ยุพยงษ์, 2546)

โรคและแมลงที่สำคัญของคะน้า

โรคและแมลงที่พบในแปลงปลูกผักคะน้าได้แก่ เน่าคอดิน (Damping-off), ใบจุดอัลเทอร์นาเรีย (Alternaria leaf spot: *Alternaria* sp.), ราน้ำค้าง (Downy mildew), เน่าดำ (Black rot : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), เน่าเละ (Soft rot : *Erwinia carotovora* sub.sp. *carotovora*), รากปม (*Meloidogyne incognita*), โรคไวรัส (Rimmer et al., 2006) และการถูกทำลายจากแมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*), เพลี้ยอ่อน (Aphid), ตัวห้ำหัดผัก (*Phyllotreta sinuata*), หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*), หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*), เป็นต้น

โรคเน่าดำ (Bacterial leaf blight or black rot)

เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำปม กะหล่ำดาว กะหล่ำดอก บร็อกโคลี ผักกาดเขียว ผักกาดขาว ผักกวางตุ้ง ผักกาดหัว ผักกาดหอม และแรดิช พบโรค

ระบาดทั่วไปตามแหล่งที่มีการปลูกผักดังกล่าวโดยเฉพาะในฤดูฝนหรือฤดูที่มีความชื้นสูง อาจเป็น รุนแรงทำความเสียหายได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เกษตรกรรู้จักกันดีคือ โรคขอบใบทอง โดยเรียกตาม ลักษณะอาการที่พืชแสดงออกเมื่อเป็นมากจะเห็นพืชทั้งแปลง มีใบแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือเหลือง คล้ายสีทอง (ศักดิ์, 2527)

ลักษณะอาการ

เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายคน้ำได้ทุกระยะการเจริญเติบโตหากเข้าทำลายในระยะกล้าหรือ ต้นอ่อน พืชมักจะตายทันที โดยจะพบว่าที่ขอบใบหรือใบเลี้ยง มีอาการไหม้แห้ง เส้นใบเน่าเป็นสีดำ ใบที่แสดงอาการจะบางกว่าปกติ ต่อมาจะแห้งเป็นสีน้ำตาลและหลุดออกจากต้น หากไม่ตายใน ระยะนี้ก็จะเกิดอาการแคะแกระ้นช้ำหรือหยุดการเจริญเติบโต ใบที่อยู่ตอนล่างๆ ของต้นจะหลุด ร่วงไป ส่วนที่เหลืออยู่จะมีสีเหลืองและเส้นใบมีสีดำ ในต้นที่โตจะพบอาการใบแก่ที่อยู่ส่วนล่างๆ ของต้น โดยอาการจะเริ่มเหลืองและแห้งตายบริเวณขอบใบขึ้นก่อนแล้วค่อยลามลึกเข้ามาในเนื้อใบ ตามแนวเส้นใบที่อยู่ระดับเดียวกันจนจรดแกนกลางของใบ ทำให้เกิดอาการเหลืองหรือแห้งเป็นสี น้ำตาลคล้ายรูปตัววี (V-shaped) ขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะอาการพิเศษเฉพาะของโรคนี้ หากเป็นรุนแรง เชื้อจะเข้าไปเจริญอยู่ที่ก้านใบ เมื่อนำใบเหล่านี้มาตัดหรือผ่าออกตามขวางจะเห็นส่วนที่เป็นท่อน้ำ เน่าเป็นสีดำ ในต้นที่มีอายุมากอาการเน่าดำของ vascular bundle จะลุกลามลงไปถึงต้นและต่อลงไป ยังราก อาการนี้มักจะเกิดอาการเหี่ยวและอาจเหลืองทั้งต้น ในกรณีดังกล่าวเชื้อจะถูกส่งกระจายไป ทั่วต้นพืช ถ้าเป็นต้นแก่ให้เมล็ดหรือฝักแล้วเชื้อก็จะไปเคลือบอยู่ที่ผิวหรือเปลือกของเมล็ด ทำให้ เกิดเป็น seed-borne และติดต่อไปยังต้นที่เกิดใหม่ได้ อาการบนใบจนผักบางชนิดอาจจะแตกต่าง ออกไปคือแทนที่จะเกิดอาการเหลืองหรือแห้งเข้ามาจากขอบใบก็จะเกิดอาการใบจุดแทน โดยจะ เกิดเป็นจุดแผลเล็กๆ สีน้ำตาลหรือม่วงขึ้นที่เนื้อใบโดยเฉพาะในระยะที่ความชื้นสูงหรือฝนตกชุก ใบพวกนี้ในที่สุดจะเหลืองทั้งใบ เหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น (Rimmer *et al.*, 2006)

ลักษณะเชื้อสาเหตุ

Xanthomonas campestris pv. *campestris* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงสั้น ขนาด 0.4-0.5x1.2-2.0 ไมครอน มี flagellar แบบ monotrichous ไม่สร้างสปอร์ เข้าทำลายพืชทางใบ และสร้าง slimy exudates ที่มีลักษณะเหนียวข้น ไม่สามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ในสภาพไม่มีอากาศ สามารถย่อย gelatin, casein, starch และ tween 80 ได้ค่อนข้างดี ไม่สร้าง indole ใน peptone water

สามารถสร้างเอนไซม์ catalase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และ urease สร้าง H_2S จาก peptone water ไม่รีดิวส์ nitrate ให้เป็น nitrite ไม่สร้าง acetoin และไม่เปลี่ยนสีของ methyl red indicator เจริญใน litmusmilk ทำให้ลีสมีสภาพเป็นด่างสามารถใช้ glucose, arabinose, mannose, lactose, sucrose และ manitol เป็นแหล่งของพลังงานได้ โดยทำให้เกิดกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar โคโลนีจะมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะกลมมน ขอบเรียบ ผิวเรียบ เป็นมันเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส เชื้อมีคุณสมบัติที่สำคัญคือผลิตรงควัตถุสีเหลืองเรียกว่า xanthomonadin pigment ไม่ละลายน้ำ เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดเป็น type species คือยังมี strain ต่าง ๆ แยกออกไปอีกหลาย strains ตามชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ไม่เป็นสาเหตุของโรคมมนุษย์ (Roberts and Koenraadt, 2007)

การแพร่กระจาย

การแพร่กระจายของเชื้อโรคที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุดโดยติดไปกับเมล็ดแล้วแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพืชอาศัยที่อยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ไถรดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบราก ทางปากใบ (stomata) ต่อมน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายสู่ส่วนต่าง ๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน น้ำชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกิน ลมพัดทำให้ใบฉีกหัก หรือแผลจากการเช็ดกรรม (Roberts and Koenraadt, 2007)

การป้องกันกำจัด

เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำติดมากับเมล็ดการป้องกันสามารถทำได้โดย วิธีการต่าง ๆ เช่น แช่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที สำหรับเมล็ดกะหล่ำปลี หรือ 18 นาที สำหรับเมล็ดกะหล่ำอื่น ๆ นอกจากการแช่น้ำอุ่น สามารถกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลีได้โดยแช่เมล็ดในสารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ cupric acetate ที่ละลายใน 0.005 N acetic acid เป็นเวลา 20 นาทีโดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 35-50 องศาเซลเซียส หรือเลือกซื้อเมล็ดพันธุ์ที่มีมาตรฐานการผลิตซึ่งผลิตจากแปลงที่ไม่มีโรคระบาดหรือได้รับการตรวจสอบแล้วว่าปราศจากเชื้อ และไม่ควรปลูกพืชตระกูลกะหล่ำลงในดินที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงมาก่อน ควรเปลี่ยนไปปลูกพืชชนิด

อื่นที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้ออย่างน้อย 2 ปี เพื่อให้เศษซากพืชและเชื้อหมดไปจากดิน กำจัดเศษซากพืชและวัชพืชตระกูลกะหล่ำในแปลงและบริเวณใกล้เคียง เพื่อไม่ให้เป็นที่อาศัยอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ เมื่อเริ่มพบโรคในแปลง ควรถอนต้นเป็นโรคนำไปเผาทิ้ง แล้วฉีดสารเคมีป้องกันโรคในแปลงปลูกด้วยสารประกอบทองแดง หรือ สเตรพโตมัยซินซัลเฟต อัตรา 400-800 ppm โดยฉีดพ่นทุกๆ 1 สัปดาห์ในช่วงที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของโรค คือเมื่ออุณหภูมิค่อนข้างสูงและความชื้นสูง (ศักดิ์, 2547)

หนอนใยผัก

หนอนใยผัก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plutella xylostella* L. ชื่อสามัญ diamondback moth จัดอยู่ในวงศ์ Yponomeutidae อันดับ Lepidoptera (อนันต์, 2521) หรือที่เกษตรกรเรียกว่า ตัวจรวด หรือตัวบินหนอนใยผักเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำได้แก่ กะหล่ำปลี, กะหล่ำดอก, คะน้า, ผักกาดขาวปลี, ผักกาดหัว, บร็อคโคลี่ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในทุกเขตของโลกทั้งเขตร้อน เขตอบอุ่น หรือเขตหนาว (Hill, 1975) โดยคาดว่าน่าจะมีจุดกำเนิดขึ้นในแถบเมดิเตอร์เรเนียน สำหรับประเทศไทยหนอนใยผักเป็นแมลงศัตรูผักที่สำคัญ โดยเฉพาะแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ (อัจฉราพร และคณะ, 2528) เช่น จังหวัดราชบุรี บางพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่ นนทบุรี และในเขตกรุงเทพฯ พบการระบาดมากตั้งแต่ช่วงปลายฤดูหนาว ถึงฤดูแล้ง โดยเฉพาะเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน ส่วนในฤดูฝนมีการระบาดน้อยเนื่องจากฝนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้หนอนใยผักตาย (Vattanatangum, 1988)

รูปร่างลักษณะและชีวประวัติหนอนใยผัก

หนอนใยผักเป็นแมลงที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน ได้เป็นอย่างดี (Stepanova, 1962) โดยสามารถเจริญเติบโตได้แม้ช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส แต่ปกติช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 5 องศาเซลเซียส ถึง 30 องศาเซลเซียส ในเขตร้อนยังไม่พบว่าหนอนใยผักมีการพักตัวแต่อย่างใด ส่วนในเขตอบอุ่นและเขตหนาวหนอนใยผักสามารถอยู่ข้ามฤดูหนาวได้ในรูปดักแด้ ส่วนตัวเต็มวัยนั้น อาศัยหลบซ่อนตามซากพืชและวัชพืชที่เหี่ยวตกล้างอยู่ (Arkhipov, 1980) พฤติกรรมของหนอนใยผักเมื่อถูกตัวจะเดินและสร้างใย ทั้งตัวห้อยลงบนพื้นดิน จึงเรียกชื่อของหนอนชนิดนี้ว่า หนอนใยผัก (ชาญณรงค์, 2550)

การควบคุมโรคโดยชีววิธีและการประยุกต์ใช้ในแปลงคะน้า

การควบคุมโรคโดยชีววิธี คือ การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลผลิตจากพันธุกรรม (gene or gene product) แต่ไม่รวมถึงการกระทำโดยตรงจากมนุษย์ (Cook และ Baker, 1983) ที่มีอยู่ทั่วไปตามบริเวณผิวพืชส่วนเหนือดิน (Munk vald และ Marois, 1993) บริเวณรากและดินรอบราก ที่มีความสามารถในการแข่งขัน (competition) ทางด้านแหล่งแร่ธาตุอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัย การเป็นปรสิต (parasite) รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น (Campbell, 1989) ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี ปัจจุบันนี้มีการนำ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณเขตรอบรากพืช (rhizosphere) และบนผิวใบพืช (epiphytic) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับราก (rhizobacteria) และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด เรียกว่า plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (นิพนธ์, 2533 ; Kloepper, 1992) กลไกสำคัญของเชื้อ PGPR คือจะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตโดยไปช่วยเปลี่ยนหรือลดความสามารถในการครอบครองรากของเชื้อโรคอื่น รวมทั้งการเพิ่มและเพื่อกระตุ้นให้พืชสร้าง growth hormone มากขึ้น การที่เชื้อจะประสบความสำเร็จเช่นนี้ได้ต้องมีปริมาณสูงมากพอ และจะต้องให้เชื้อใกล้กับเมล็ดของพืชมากที่สุด เมื่อรากงอกออกมาจะได้เจริญรอบรากที่ยืดยาวออกไปได้อย่างทั่วถึง และเชื้อ PGPR นี้แสดงคุณสมบัติได้ดีเมื่ออยู่ในดินธรรมชาติ (นิพนธ์, 2533 ; Bowen and Rovira, 1976) จัดเป็นกลไกที่สำคัญของเชื้อปฏิปักษ์ที่นำมาปรับใช้ในการควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียที่อาศัยตามบริเวณรากและดินรอบรากพืชที่มีความสามารถในการอยู่อาศัยร่วมกับรากพืชและไม่เป็นโทษกับพืช (mutualism or symbiosis) มาเพิ่มปริมาณและใส่ลงไปในดินเพาะปลูกเพื่อส่งเสริมการใช้ธาตุอาหารของพืช ตลอดจนสามารถกระตุ้นให้พืชผลิตสารต่าง ๆ ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อโรค รวมทั้งการผลิตสารบางชนิดที่กระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรงเต็มพิกัดของพันธุกรรม จัดเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและลดปัญหาในการใช้สารเคมี ซึ่งเรียกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) ในธรรมชาติจะมีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยเชื่อนี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ คือ

1. การแข่งขัน (Competition) เชื้อปฏิปักษ์ มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า (Suwanto *et al.*, 1996) ทำให้เชื้อ

โรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงมีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือ การแข่งขันโดยการแย่งอาหารเป็นลักษณะของ ที่จะไปลดปริมาณสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อโรค เนื่องจาก biocontrol agent เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารหรือมีความสามารถในการเจริญเร็วมาก ชนิดของอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดิน และพืชอาศัย ซึ่งได้แก่ ธาตุเหล็ก คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน และ micronutrient ซึ่งมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญบริเวณรากพืชได้รวดเร็ว และแย่งแย่งในตำแหน่งของการติดเชื้อ (site of infection) เป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งเชื้อที่ทำลายรากและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (อุไรฉา, 2543)

2. การผลิตสารฆ่าเชื้อโรค (Antibiosis) เชื้อปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ตลอดจน enzyme ต่างๆ (Campbell, 1989) พบว่ากลไกนี้เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 จะผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า Agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืชได้

3. การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืช ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต เช่น *Erwinia uredinolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิมหรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (นิพนธ์, 2533)

4. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย (Plant Growth Promotion) โดยจุลินทรีย์จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระยะกล้าเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถครอบครองที่บริเวณรากพืชและเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่บริเวณรากได้ดี นอกจากนี้จะผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตชนิดเดียวกับที่พืชผลิตได้ เช่น ออกซิน จึงช่วยเพิ่มพูนการทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี (สุตฤดี, 2551)

5. การชักนำให้พืชอาศัยเกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance) เป็นกลไกที่สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างสารปกป้องตนเองได้เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในช่วงหลังจากใช้เชื้อปฏิปักษ์แล้วมีเชื้อโรคเข้าทำลาย (สุคฤดี, 2548)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s

มีรายงานการแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ที่แยกได้จากดินบริเวณรากกะหล่ำดอกมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและได้เป็นอย่างดี (วิลาวรรณ และสุคฤดี, 2550) รวมทั้งการประเมินประสิทธิภาพของระดับความเข้มข้น วิธีการใช้ และความถี่ที่เหมาะสมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s ผลการทดลองประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันในการควบคุมโรคเน่าและของกะหล่ำดอกในเรือนทดลอง พบว่าการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นด้วย suspension เชื้อ SP007s ที่ความเข้มข้น 0.1 OD สามารถลดความรุนแรงโรคเน่าและได้สูง 75.26 เปอร์เซ็นต์ นำระดับความเข้มข้นดังกล่าว ประยุกต์ใช้ในสภาพไร่ พบว่าการคลุกเมล็ดด้วย suspension เชื้อ SP007s ความเข้มข้น 0.15 OD ก่อนปลูก และพ่น suspension เชื้อ SP007s ความเข้มข้น 0.1 OD 4 ครั้ง ที่อายุ 14, 28, 32, และ 46 วัน มีประสิทธิภาพสูงในการเสริมการเจริญเติบโต ลดความรุนแรงโรคเน่าและ ขอบใบทอง และใบจุดอัลเทอร์เนเรียได้ดีที่สุด โดยลดความรุนแรงของโรคได้ 80.26, 82.08, และ 86.01 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตรวม 1.97 ตัน/ไร่ตามลำดับ (วิลาวรรณ และสุคฤดี, 2551) ได้มีการศึกษานำเชื้อสายพันธุ์ SP007s นี้มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเน่าดำของกะหล่ำในท้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค และพบว่าการปลูกโดยคลุกเมล็ดก่อนปลูกร่วมกับการพ่นใบสองครั้งด้วย SP007s แสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค โดยสามารถลดความรุนแรงโรคเน่าดำได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ดิยากร และสุคฤดี, 2550) มีรายงานการนำไปใช้ร่วมกับสารชีวภัณฑ์และจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น การใช้สารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP009s คลุกเมล็ดและพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP007s ร่วมกับสารชีวภัณฑ์ (เกอมาร์ บี เอ็ม8®) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากะหล่ำดอกในส่วน ของ น้ำหนัก ความสูง และความยาวใบ ได้ดีที่สุดเท่ากับ 22.95, 19.03, และ 14.34 เซนติเมตร ตามลำดับ และสามารถควบคุมโรคเน่าและของกะหล่ำดอกที่เกิดจาก *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้ดีที่สุดโดยความรุนแรงของโรคเท่ากับ 17.30 เปอร์เซ็นต์ส่งผลให้ผลผลิตในกรรมวิธีดังกล่าวดีที่สุดเท่ากับ 1.70 ตัน/ไร่ การใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP007s คลุกเมล็ด และใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SP009s ร่วมกับสารสกัดสาหร่ายพ่นใบ สามารถควบคุมโรคขอบใบทองของกะหล่ำดอกที่เกิดจาก *X. campestris* pv. *campestris* ได้ดีที่สุด

โดยความรุนแรงของโรคเท่ากับ 8.03 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตเท่ากับ 1.67 ตัน/ไร่ (วิลาวรรณ และคณะ, 2550) มีรายงานการประเมินความเสี่ยงผลกระทบต่อประชาคมแบคทีเรียเมื่อใช้สายพันธุ์ SP007s ในการผลิตกะหล่ำดอกพบว่าประชากรของแบคทีเรีย บริเวณรอบ ๆ รากหลังการเก็บเกี่ยวพืชไม่มีการเปลี่ยนแปลงและ/หรือเพิ่มขึ้น 2-4 เท่า และเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ มีจำนวนลดลง และพบว่าไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงาน ATPase ในระบบ Type III secretion (วิลาวรรณ และสุคติ, 2550) แต่ยังไม่มีการศึกษาในระดับลึกถึงไปถึงการกลไกการทำงาน การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาถึงกลไกการชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ SP007s ในรูปแบบชีวภัณฑ์

กลไกการป้องกันตนเองของพืช (Plant defense response)

การชักนำให้พืชมีกลไกในการปกป้องตัวเองและมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เชื้อ biological control agent (BCA) สามารถชักนำกระบวนการปกป้องตัวเองจากการทำลายของเชื้อโรคด้วยวิธีต่าง ๆ กัน (Prathuangwong et al, 2000) โดยการเกิด oxidative burst ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางชีวเคมีในพืช เกิดการสะสมของ phytoalexin และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช (PR protein) เช่น เอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในการชักนำความต้านทานของพืชที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อเป็นความสัมพันธ์ของเชื้อกับพืชอาศัย เป็นกระบวนการจดจำ (recognition) ของพืชต่อเชื้อโดยเฉพาะเชื้อสาเหตุโรค ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุไฟฟ้า (ion fluxes exchange) ที่ชั้นพลาสมาเมมเบรน ก่อให้เกิดการแตกตัวของออกซิเจนและมีการสร้าง nitric oxide และสารพวก reactive oxygen species (ROSs) เช่น superoxide dismutase และ hydrogen peroxide ก่อให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโปรตีนปกป้องตนเองของพืช ประกอบด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสารสังเคราะห์ phytoalexin หรือ PR protein เช่น MAPK superfamily kinase, superoxide dismutase, NADPH oxidase, lipoxygenase, glucosyl transferase นอกจากนี้ยังพบว่าการสะสมของสารตัวกลางและเอนไซม์ของกระบวนการ phenolic accumulation pathway ประกอบด้วยเอนไซม์ peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, รวมทั้ง salicylic acid และสาร benzoic acid ซึ่งสารเหล่านี้เป็น signal molecule ส่งสัญญาณให้พืชเกิดความต้านทานทั้งระบบ (systemic acquired resistance : SAR และ induced systemic resistance : ISR) (Van L.C and Van Strien, 1999)

Superoxide dismutase (SOD)

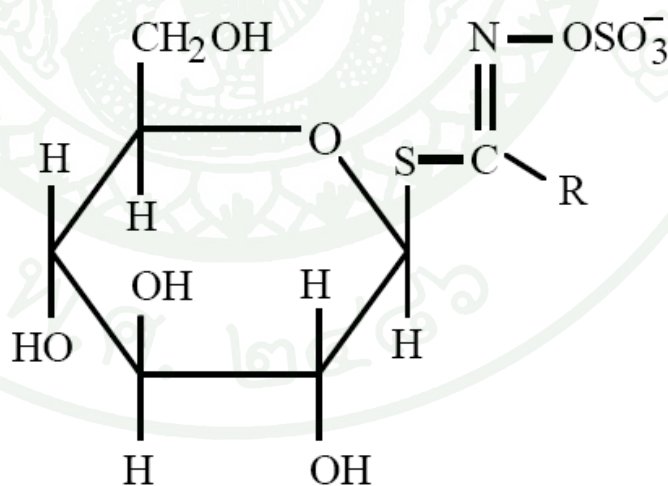
SOD เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในเซลล์เชื้อโรค และเซลล์พืช SOD เป็นเอนไซม์ที่มีการเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนอง จากกระบวนการปกป้องตนเองของพืช ซึ่งเกิดจากความเครียดที่มีผลกระทบจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต พบว่าพืชจะผลิตสาร SOD ชนิดต่าง ๆ กัน ซึ่ง SOD จะมีปริมาณสัมพันธ์กับกับปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่สมดุล (oxidative stress) และเป็นพิษต่อเซลล์พืช สารดังกล่าวจะมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา (catalyse) dismutation ของอนุมูลอิสระของออกซิเจน (O_2^-) (superoxide radical) ให้รวมตัวเป็นสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ H_2O_2 เป็นต้น โดยกลไกการปกป้องตนเองดังกล่าวของเซลล์พืชสามารถชักนำได้โดยแบคทีเรีย ทั้งที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคและแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Levy, 1992; สัมฤทธิ์, 2544) โดยมีรายงานว่า SOD เป็นเอนไซม์แรกที่ถูกออกมาปกป้องการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ ซึ่งสามารถแบ่งแยกได้สามรูปแบบด้วยกัน คือ Mn^{2+} , Fe^{2+} และ Cu^{2+}/Zn^{2+} พบมีในเซลล์พวก Prokaryote และของเหลวในไมโทคอนเดรียของเซลล์ eukaryote ซึ่งพบว่าในหน่วยพันธุกรรมสำหรับผลิตเอนไซม์ SOD จะใช้แบคทีเรียเป็นตัวกลางในการขนถ่าย (Pitcher *et al.*, 1991) มีรายงานว่าพืชที่มีการตัดต่อพันธุกรรมจะมีระดับ SOD สูงขึ้นได้ถึง 1.5-6 เท่า ซึ่งเป็นระดับที่สามารถทนต่อการเข้าทำลายของพืชได้ (สัมฤทธิ์, 2544) มีรายงานว่า SOD มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Mycosphaerella fragariae* ที่ทำให้เกิดใบไหม้ในสตรอเบอรี่ (Behrouz *et al.*, 2006) ทั้งยังสามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์การตัดสินใจในการคัดเลือกสายพันธุ์ เช่น ใช้ระดับความแตกต่างของ SOD โดยพบว่าในพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerospora graminicola* ที่ทำให้เกิดโรคราน้ำค้าง ผลการทดลองพบว่าในพันธุ์ต้านทานจะมี SOD สูงที่สุด (Babitha *et al.*, 2002) มีรายงานการทดลองทดสอบการเปรียบเทียบการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และ มข.35 พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 สามารถเจริญเติบโตในภาวะแล้งได้ดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และสามารถรักษาระดับปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงในใบล่างไว้ได้ดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 ตลอดระยะเวลา 18 วันที่อยู่ในภาวะเค็ม การทนต่อภาวะเค็มของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 นี้มีความสัมพันธ์ กับระบบขจัด ROSs อย่างชัดเจน โดยพบว่าเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ SOD และ catalase ในใบบริเวณยอด ดังนั้นจากการทดลองดังกล่าวทำให้ระบุได้ว่าประสิทธิภาพของถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ในการต้านทานต่อภาวะแล้งและเค็มที่แตกต่างกันส่วนหนึ่งมาจากบทบาทในการขจัด ROSs ของเอนไซม์ในระบบ ทั้งนี้คุณสมบัติในการชักนำให้พืชเกิดกลไกการต้านทาน (plant defend responses) จะเกี่ยวข้องกับกลไกการสะสม

เอนไซม์ต่าง ๆ ที่นำไปสู่การสร้างสารกลุ่ม phytoalexin ซึ่งเป็นสาร secondary metabolize ออกมา ยับยั้งเชื้อสาเหตุต่าง ๆ โรคและแมลง (Klaus and Heribert, 2004)

Glucosinolate (GLS)

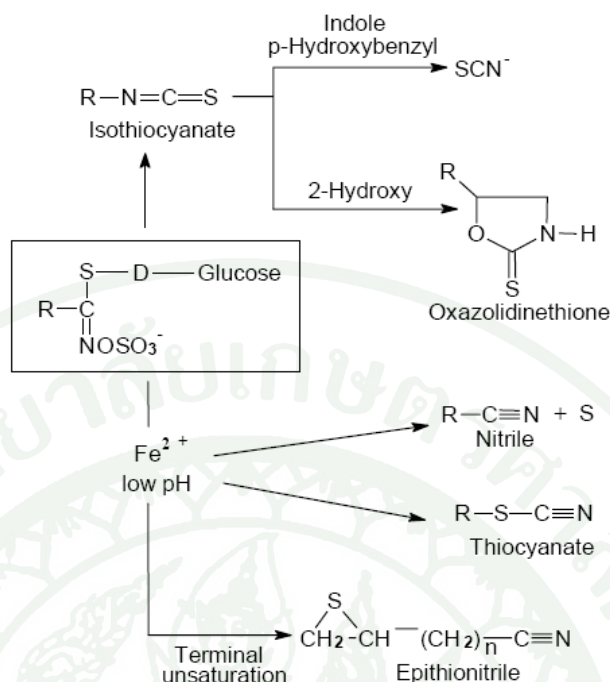
GLS เป็นสารที่มีรายงานว่าพบมากในพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นสารประกอบกำมะถันจากเมแทบอลิซึมทุติยภูมิที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง ซึ่งพบในใบพืชเลี้ยงดูไม่น้อยกว่า 15 ประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในตระกูลกะหล่ำ สารประกอบนี้มีโครงสร้างที่มีหมู่กำมะถันที่เป็น (sulfhydryl group, -SH) และ sulfo group ส่วนความยาวของโซ่ข้าง (R) (ภาพที่ 1) แตกต่างกันตามชนิดพืช glucosinolate อยู่ใน vacuole ของใบกะหล่ำ และมีเอนไซม์ myrosinase เปลี่ยน glucosinolate ให้อยู่ในรูป isothiocyanate และ thiocyanate ในรูปไอระเหย (volatile) (ภาพที่ 2) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโรคและแมลงได้หลายชนิด และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกเช่นกัน สาร glucosinolate ดังกล่าวพบว่ามีหมู่ R ที่มีความแตกต่างกันทำให้มีชื่อและโครงสร้างที่แตกต่างกันอีก เช่น glucoiberin, gluconapin, sinigrin, progoitrin และ glucobrassicin เป็นต้น โดยปกติจะเป็นสารทุติยภูมิที่พืชผลิตจากกระบวนการปกป้องตัวเอง พบว่ามีความสำคัญต่อพืช 2 ประการ คือ เป็นสารที่พืชใช้ปกป้องไม่ให้ศัตรูพืชมารบกวน และเป็นแหล่งสำรองกำมะถัน กล่าวคือ เมื่อพืชอยู่ในช่วงที่ต้องใช้ธาตุนี้มาก เช่น ส่วนเหนือดินเจริญรวดเร็วหรือกำลังพัฒนาเมล็ด glucosinolate จะถูกเอนไซม์ย่อยและปลดปล่อยกำมะถันทั้งหมดเข้าสู่วิถีการใช้ประโยชน์อีกครั้งหนึ่ง (Craig and Sam, 2002) การสะสมของสารมีในเมล็ดมากที่สุด 10 เปอร์เซ็นต์ (Rosa *et al.*, 1997) และในใบ 1 เปอร์เซ็นต์ (Josefsson, 1997) ซึ่งในแต่ละพืชจะมี glucosinolate ที่ต่างกัน ปกติจะมีประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์หรือน้อยกว่านั้น มีรายงานว่า glucosinolate มีส่วนช่วยในการงอกของเมล็ดเนื่องจากสารนี้จะ เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อโรคที่อยู่ในดิน (Choesin and Boerner, 1991; Siemens *et al.*, 2002) และสารนี้มีประโยชน์ เช่น ในด้านการแพทย์พบว่า glucosinolate มีศักยภาพในการต้านมะเร็ง เช่น บร็อคโคลีมีปริมาณ glucosinolate ชนิด glucoraphanin ในปริมาณสูง มีศักยภาพในการต้านมะเร็งที่สำคัญ และพบว่าผู้บริโภครักที่รับประทานผักที่มีสารนี้ สารสามารถที่ทำหน้าที่ในการต้านทานการก่อตัวของเซลล์มะเร็ง ช่วยเพิ่มระดับ glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและที่สำคัญช่วยดับพิษสารพิษออกจากร่างกาย (Srinibas *et al.*, 2000) ส่วนในด้านกีฏวิทยา มีรายงานว่า เป็นสารระเหยขับไล่แมลงและหากหนอนมีการกักกินอาจเกิดการตายได้ มีรายงานว่าแมลงหวี่เกิดการอพยพถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 10 นาที เมื่อได้รับสาร isothiocyanate เข้าไป (Lichtenstein *et al.*, 1964) เป็นพืชต่อต้านด้วงในตระกูล *Otiorhynchus sulcatus* (Borek *et al.*, 1998) ด้วงหมัดกระโดด *Phyllotreta*

nemorum L., และแมลงในตระกูล Coleoptera, Chrysomelidae, และ Alticine เป็นต้น และในด้านโรคพืชมีรายงานการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น ใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Penicillium expansum* และ *Salmonella typhimurium* ที่ติดมากับผักได้ (Tiedink *et al.*, 1991) ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคกับพืชได้เช่น *Rhizopus stolonifer* (Ruud Verkerk *et al.*, 2001) ลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Meloidogyn chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1991) มีรายงานว่าเป็นพืชต่อ *Pythium irregular*, *Alternaria* spp., *Perronospora parasitica*, *Leptosphaeria maculans* และ *Rhizoctonia solani* เป็นต้น (Manici *et al.*, 2000) ตลอดจนยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกับพืชได้หลายชนิด (Manici *et al.*, 1997) โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคพืช ซึ่งปริมาณในการยับยั้งได้อยู่ที่ 34-54 ไมโครกรัม (Isshiki K, *et al.*, 1992) มีรายงานการนำ 0.02 เปอร์เซ็นต์ glucosinolate เคลือบเมล็ดมันฝรั่งส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 6-15 เปอร์เซ็นต์ และหากทำการพ่นแอปเปิ้ลจะมีผลทำให้ผิวผลแอปเปิ้ลสีแดงขึ้น (Beekhuis, 1975; Dustman and Duncan, 1940) และพบว่า glucosinolate สามารถยับยั้งโรคทางดินได้ เช่น สาเหตุจาก *Rhizoctonia* sp. ที่ปริมาณสาร 110-1500 ไมโครกรัม เชื้อ *Myrothecium* ที่ปริมาณสาร 20-490 ไมโครกรัม และ *Pythium* ที่ปริมาณสาร 10-24 ไมโครกรัม (Frenwick *et al.*, 1983; Smelt *et al.*, 1989) แต่ยังไม่มียางานการหาความสัมพันธ์ของสาร glucosinolate ที่มีการใช้แบคทีเรียปฏิบัฏษ์ในการควบคุมโรค



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ glucosinolate ซึ่งประกอบด้วย กำมะถันกลุ่ม sulfhydryl group, -SH และหมู่ซัลโฟ sulfo group ที่โซ่ข้าง R

ที่มา: Brown and Morra (2005)



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสลายสาร glucosinolate มีเอนไซม์ myrosinase เปลี่ยนสาร glucosinolate ให้อยู่ในรูป isothiocyanate และ thiocyanate

ที่มา: Brown and Morra (2005)

ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช

Burges (1998) กล่าวว่า การสร้างผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อควบคุมโรคและแมลงจะต้องมีการคำนึงถึง ความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยจุลินทรีย์สามารถปรับตัวและอยู่รอดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา รวมถึงขั้นตอนการเตรียมการผลิต และค่าใช้จ่ายในการผลิตที่มีราคาถูก และไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่เป้าหมายที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงเป็นอันดับแรก คือ จุลินทรีย์ที่ผลิตจะต้องมีคุณสมบัติในการควบคุมโรคและแมลงได้หลากหลายกลไก เช่น การแข่งขันการกินอาหาร การสร้างสารยับยั้งศัตรูพืช การชักนำภูมิคุ้มกัน การส่งเสริมการเจริญเติบโต เป็นต้น (Lisansky, 1985) ซึ่งจุลินทรีย์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์จะอยู่ในรูปคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือกลายพันธุ์หากเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์จนกระทั่งมีการนำไปใช้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงรูปแบบผลิตภัณฑ์

ที่จุลินทรีย์จะไปถึงในตัวกลางที่เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ เช่นการผลิตจุลินทรีย์รูปแบบเม็ด แบบผง แบบฟู่

ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่หลักในการออกฤทธิ์และสารพุง (supporter) หรือ สารพา (carrier) ซึ่งแบ่งเป็นสารอินทรีย์ เช่น vermiculite, clay, calcium sulphate และ mineral soil และสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันพืช ขี้เลื่อย รำข้าวสาลี เป็นต้น โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเฉื่อย และทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายตัวอย่างทั่วถึงเมื่อผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ไปใช้งาน สารพาที่เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Fravel *et al.* (1995) พบว่าสารอินทรีย์ เช่น ข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าวสาลี จะมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับ ซึ่งมีผลต่อการดำรงชีวิตรอดของเชื้อหลังการทำแห้งและพบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จ เชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ขี้ข้าวโพดเป็นสารพาปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองหรือรำข้าวสาลี หฤษฎ์ (2551) รายงานว่าการพัฒนาแบคทีเรียปฏิบัฏเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โดยแบคทีเรียปฏิบัฏไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ใช้สารพา 4 ชนิดคือ dolomite, talcum powder, hyflo supercell และ diatomaceous earth พบว่าสารพาชนิด dolomite มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ประกอบเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ นอกจากนี้มีการเติมสารเสริมประสิทธิภาพเซลล์เพื่อป้องกันปฏิกิริยาของโปรตีนและเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่นการใช้ alpha, alpha-trehalose-borate เพื่อป้องกัน *Lactobacillus acidophilus* ในระหว่างกระบวนการทำผลิตแบบแช่แข็ง โดย trehalose มีประสิทธิภาพเป็นสารป้องกันเซลล์ที่ดีนิยมใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ borate ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายและเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ trehalose โดย Abadias (2001) ศึกษาการเติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อยีสต์ *Candida sake* โดยช่วยให้มีชีวิตรอด 28.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกระบวนการการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างยั้งที่จะต้องมียีสต์จุลินทรีย์ตั้งต้นที่แข็งแรงและมีคุณภาพดีในปริมาณมาก ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณจึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ

ส่วนประกอบหลักที่สำคัญ คือ จุลินทรีย์ ดังนั้นอาหารที่เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญ ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏสมใจ (2552) รายงานว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการปมเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบดังนี้ คือ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจน โดยน้ำ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด น้ำช่วย

ละลายสารอาหารชนิดต่าง ๆ ทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมสารอาหารเข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้ การนำน้ำมาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปจะต้องพิจารณาสมบัติต่าง ๆ ดังนี้คือ pH ปริมาณของน้ำแข็งที่ละลายน้ำ และการปนเปื้อนจากสิ่งโสโครก เช่น น้ำเสีย เป็นต้น สำหรับแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์แต่ละชนิดอาจได้พลังงานในการดำรงชีวิตมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอนเช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังอาจใช้ methan หรือเมทานอล เป็นแหล่งพลังงานได้ด้วย

แหล่งคาร์บอน โดยคาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีมาก และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน คือ ผลผลิตที่ต้องการ ราคา ความบริสุทธิ์ กฎหมาย และวิธีการสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อ อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการสร้างผลผลิตนั้น สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีอิทธิพลต่อการสร้างมวลเซลล์ หรือผลผลิต ทั้งสาร primary metabolites และ secondary metabolite ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถ metabolite ได้อย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นสูง ๆ พบว่าจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่สร้างผลผลิตที่เป็นสาร secondary metabolite ได้ต่ำ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ซึ่งการแก้ปัญหานี้อาจเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เกิดการย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ เช่น แลคโตสแทน แต่ในภายหลังได้มีการเปลี่ยนมาใช้ระบบต่อเนื่อง หรือกึ่งต่อเนื่อง โดยค่อย ๆ เติมกลูโคสหรือซูโครสลงไปให้อาหารทีละน้อย

แหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย กลีโอสแอมโมเนีย และไนเตรท เป็นต้น แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปแบบกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย ก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน จุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะพวกมิวแคนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรด อะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่

เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน วัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มาซีเคีย distillers' soluble , casein hydrolysate, fish meal และ yeast extract เป็นต้น ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนขึ้นกับจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางอย่าง ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ไม่แทบโอเลซ์ได้อย่างรวดเร็วอาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย โดยเฉพาะในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ metabolite ได้อย่างช้า ๆ (Welker and Cambel, 1963)

ปัจจัยในการพิจารณาเลือกวัตถุดิบ ในกระบวนการหมักขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการ อาจใช้สารบริสุทธิ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ แต่กระบวนการหมักขนาดใหญ่ในระดับอุตสาหกรรม การใช้สารบริสุทธิ์อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีราคาแพง โดยทั่วไปการเลือกวัตถุดิบเพื่อใช้ผลิตในอุตสาหกรรมการหมัก จะพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ คือ ราคาถูก คุณภาพคงที่ และมีใช้ตลอดทั้งปี ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ต่อกรัมวัตถุดิบที่ใช้ไปได้มากที่สุด ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ความเข้มข้นสูงสุด มีอัตราการสร้างผลผลิตสูงสุด และเกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด ตลอดจนเกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้อยที่สุด โดยเฉพาะการให้อากาศและการกวน ส่วนผสม ชัยสิทธิ์ และคณะ 2548 รายงานว่าได้นำกากถั่วเหลือง กากน้ำตาลและน้ำสะอาด มาทดแทนแหล่งอาหารสังเคราะห์เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquifaciens* KPS46 ซึ่งพบว่าให้ผลดีเทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพิสูจน์โรคเน่าดำและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุและการรวบรวมหนอนใยผัก

1.1 การรวบรวมตัวอย่างคะน้ำเป็นโรคเน่าดำ

เก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำหรือขอบใบทองจากใบคะน้ำที่แสดงอาการโรคเน่าดำ โดยขอบใบคะน้ำจะมีสีเหลืองมีลักษณะเป็นรูปปลีหรือสามเหลี่ยม คล้ายรูปตัววีจากขอบใบเข้าสู่กลางใบ (ศักดิ์, 2527) โดยการสุ่มตัวอย่างใบจากแหล่งผลิตคะน้ำที่สำคัญของประเทศ ได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี และอ่างทอง โดยกำหนดพื้นที่สำรวจแบบสุ่มกระจายทั่วแปลงเป็นจำนวน 10 จุด ตลอดเส้นทางการสำรวจ (จุดสำรวจต้องอยู่ห่างจากขอบแปลงอย่างน้อย 2 เมตร แต่ละจุดห่างกันพอประมาณขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของแปลงสุ่มเก็บตัวอย่างลักษณะซิกแซกรูปอักษร W ตามวิธีของ Delp *et al.* (1986) พิจารณาลักษณะอาการโรค โดยเปรียบเทียบกับอาการกับคู่มือ Compendium of Brassica Diseases (Rimmer *et al.*, 2006) เก็บตัวอย่างคะน้ำที่รวบรวมได้และแสดงอาการผิดปกติดังกล่าวใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ รัดปากถุงให้แน่น เขียนข้อมูลรายละเอียด ได้แก่ พันธุ์ อายุ วันเดือนปีที่เก็บ เพื่อจัดเป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับนำไปแยกเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคในขั้นต่อไป

1.2 การแยกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ

นำตัวอย่างใบคะน้ำที่รวบรวมได้จากแปลงเกษตรกรมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำตัวอย่างคะน้ำที่แสดงอาการขอบใบเริ่มเหลืองมีลักษณะเป็นรูปปลีหรือสามเหลี่ยม คล้ายรูปตัววี มาตัดแยกระหว่างเนื้อเยื่อพืชที่ดีและมีสีเหลือง นำชิ้นพืชขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร มาเช็ดด้วย clorox 10 เปอร์เซนต์ นาน 3-5 นาที ตามด้วยน้ำกลั่นล้างเช็ด นาน 5 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยทิชชูปลอดเชื้อ และ วางชิ้นพืชลงบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็สาเหตุโรคเน่าดำที่เจริญบนอาหาร NGA โดยโคโลนีจะมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะกลมมน ขอบเรียบ ผิวเรียบเป็นมัน มา cross streak บนอาหาร NGA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ cross streak ซ้ำอีกประมาณ 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้แบบชั่วคราวในอาหารเลี้ยง NGA เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.3 การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน (hypersensitive response)

เตรียม suspension ของเชื้อที่คาดว่าเป็น *X. campestris* pv. *campestris* ที่ทำให้เกิดโรคเน่าดำจาก 1.2 เลี้ยงในอาหารเหลว NGB อายุ 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่น เท่ากับ 0.2 OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (มีปริมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) จากนั้นใช้เข็มฉีดยาที่มีหลอดแบบพลาสติกโดยปลดเข็มฉีดยาออกและใช้เฉพาะหลอดขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลดเชื้อดูด suspension เชื้อตรวจสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ฟองอากาศออก กดปลายกระบอกเข็ม เพื่อฉีด suspension แบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าสู่เนื้อใบของยาสูบ (*Nicotina tabacum* cv. *xanthi*) อายุ 45 วัน อย่างช้า ๆ ใบยาสูบจะมีลักษณะน้ำน้ำ (water soak) หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ ตรวจสอบผลโดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคจะเกิดอาการตายของเซลล์บนใบยาสูบ ทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรครายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง (Schaad, 1988) หลังฉีด suspension ของเชื้อสาเหตุโรค

1.4 ทดสอบความสามารถในการก่อโรค

นำเชื้อที่มีแนวโน้มในการเป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่คัดเลือกจากวิธี tissue transplanting แต่ละเชื้อ 1 โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่ละโคโลนีเดียว 1-2 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหาร NGB 24-48 ชั่วโมง และเตรียม suspension ของแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อโดยปรับค่าความขุ่น เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (มีปริมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ผสมสารจับใบ 1 มิลลิลิตร ต่อเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ 5 มิลลิลิตร/กระถาง พ่นบนใบคะน้าที่อายุ 30-45 วัน (artificial inoculation) เปรียบเทียบลักษณะอาการและประเมินความรุนแรงของโรคที่ปรากฏหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน หลังปลูกเชื้อโดยประเมินจากระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีการ วิลาวรรณและคณะ (2549) โดยแบ่งการประเมินความรุนแรงโรคออกเป็น 5 ระดับ (ตารางที่ 1) คือ

ระดับ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ

ระดับ 1 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 1-25 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 2 = ลักษณะอาการโรคบนใบใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 3 = ลักษณะอาการโรคบนใบใบเหลืองเป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 51-75 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด

ระดับ 4 = ลักษณะอาการโรคบนใบใบเหลืองเป็นจุดรุนแรง 76-100 เปอร์เซ็นต์หรือใบแห้งร่วงหล่น

ตารางที่ 1 ระดับการพิจารณาความรุนแรงของโรคเน่าดำ

ระดับความรุนแรงโรค	เปอร์เซ็นต์ความรุนแรง	ลักษณะอาการของโรค	ภาพ
0	0	ลักษณะอาการโรคบนใบรุนแรงเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด	
1	1-25	ลักษณะอาการโรคบนใบรุนแรงเท่ากับ 1-25 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด	
2	26-50	ลักษณะอาการโรคบนใบรุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด	
3	51-75	ลักษณะอาการโรคบนใบรุนแรงเท่ากับ 51-75 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด	
4	76-100	ลักษณะอาการโรคบนใบรุนแรงเท่ากับ 76-100 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด	

แยกเชื้อจากต้นค่น้ำ (reisolation) ที่ถูกปลูกเชื้อข้างต้นมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งบนต้นค่น้ำชุดใหม่ (reinoculation) ตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) นำเชื้อที่แยกจากค่น้ำที่แสดงอาการโรคเน่าค่น้ำ streak บนอาหาร NGA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาเพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

1.5 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุล เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris*

1.5.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา

เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคเน่าค่น้ำบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะโคโลนี โดยเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ คือ สี และลักษณะรูปร่างของโคโลนี และจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะ colony morphology และทดสอบ Gram reaction โดยหยด 3 เปอร์เซ็นต์ โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (3% KOH) ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NGA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระจายลงบนแผ่นกระจกสไลด์บริเวณที่หยด 3% KOH ทิ้งไว้สักครู่ใช้ loop แตะบริเวณที่ทำการทดสอบถ้าเห็นขีดเป็นเส้นแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ถ้าไม่เห็นขีดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ยืนยันผลโดยนำไปย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) โดยใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียแล้วกระจายลงบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟมาเชื้อและทำลายคราบมันแล้ว ยึด (fixed) เซลล์ด้วยการลนเปลวไฟห่างๆ 1-2 ครั้ง จากนั้นนำไปย้อมสีแบบแกรมด้วยสาร crystal violet และ safranin-O ตามวิธีการของ Schaad (1988) โดยที่เซลล์แบคทีเรียที่ติดสีม่วงของ crystal violet จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ safranin-O จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Suslow and Schroth, 1982)

1.5.2 ลักษณะทางชีวเคมีบางประการ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าค่น้ำบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง นำมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีในการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้แก่ oxygen relationship, motility, gelatin hydrolysis, catalase production, levan formation, starch hydrolysis, growth on potato, citrate utilization, oxidase test, และ lipolytic activity วิธีการดังต่อไปนี้

1.5.2.1 Oxygen relationship

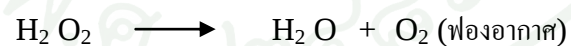
นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำ stab inoculate ในอาหาร NGA หลอมเหลวที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อละ 1 หลอด เอามือ หมุนหลอดให้เชื้อผสมกับอาหารโดยอย่าให้เกิดฟองอากาศ เมื่ออาหารแข็งนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 วัน ถ้าเชื้อเจริญเฉพาะผิวหน้าวุ้นแสดงว่าเป็น aerobe ถ้าเจริญที่ก้นหลอดเป็นพวก anaerobe ถ้าเจริญจากผิวหน้าลงมากกลางหลอดเป็น facultative anaerobe และถ้าเจริญได้ผิวอาหารลง มาเล็กน้อยจัดเป็น microaerophilic

1.5.2.2 Gelatin hydrolysis

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำการ stab inoculation ในอาหาร NGA+12% gelatin หลอดละ 1 เชื้อ ทำ control เปรียบเทียบ 1 หลอด โดยแทงด้วยเข็มเย็บที่ไม้ได้เย็บเชื้อ นำหลอดทดสอบบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน นำมาตรวจผลโดยนำไปแช่ในน้ำแข็ง หรือตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความสามารถในการ ย่อย gelatin ของเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อที่สามารถย่อยสลาย gelatin ได้นั้นจะทำให้ gelatin ไม่ แข็งตัวหลังจากนำไปแช่เย็น

1.5.2.3 Catalase production

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak บนอาหารเอียง NGA ในหลอดทดลองเชื้อละ 1 หลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เติมน้ำด้วย H_2O_2 ให้ท่วมอาหารแล้วสังเกตการสร้างฟองอากาศดังสมการ



ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ catalase จะเกิดฟองอากาศขึ้นที่ผิว

1.5.2.4 Levan formation

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล sucrose โดยการนำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ streak บนอาหาร NGA ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะโคโลนีทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ถ้าเชื้อสร้างสาร levan (poly-fructose) ซึ่งเป็นสาร extracellular capsular substrate โคโลนีจะ

มีเมือกเยิ้ม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร เมื่อมีอายุ 2 วัน และ 5-7 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 3 วัน และ โคลิโคนีจะมีความนูน

1.5.2.5 Starch hydrolysis

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบน starch agar โดย streak เป็นเส้นตรงบนอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารทดสอบ Gram's Iodine (potassium iodine) เทให้ท่วมอาหารในจาน แล้วสังเกตการณ์เกิดสีถ้าเกิดบริเวณใด ๆ รอบรอยที่มีเชื้อเจริญอยู่แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ ถ้าไม่สามารถย่อยแป้งในอาหาร แป้งจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็นสีน้ำเงินปนม่วงเกิดขึ้น

1.5.2.6 Potato soft rot

นำหัวมันฝรั่งที่ล้างสะอาดและแห้งดีแล้วจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำผ่านเปลวไฟจากนั้นหั่นมันฝรั่งตามขวางให้หนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตรโดยใช้มีดที่ปราศจากเชื้อ วางชิ้นมันฝรั่งบนกระดาษกรองที่วางในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนกระดาษกรอง นำ suspension เชื้อแบคทีเรียความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 cfu/ml หยดตรงกลางบนผิวหน้าชิ้นมันฝรั่งที่หั่นใหม่ ๆ แล้วบ่มไว้ 3 วัน สังเกตการเน่าของชิ้นมันฝรั่ง

1.5.2.7 Citrate utilization

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak ลงบนอาหารเลี้ยง citrate agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-7 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่สามารถใช้ citrate เป็น carbon source จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

1.5.2.8 Oxidase test

เป็นการทดสอบการผลิต cytochrome oxidase ของแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเข้าเชื้อแต่ละเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร NGA ถูบนกระดาษกรองที่อ้อมด้วยสารทดสอบ 1% tetra methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride สังเกตการเกิดสีบนกระดาษกรอง ถ้าไม่มีสีเกิดขึ้นหรือใช้เวลาในการเกิดสีนานกว่า 1 นาที แสดงว่าไม่มีการสร้างเอ็นไซม์นี้

1.5.2.9 Lipolytic activity

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24-48 ชั่วโมง มา streak เป็นเส้นตรงบนอาหาร tween-80 agar ทำ 4 เชื้อ/plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของอาหารบริเวณรอบ ๆ รอยที่ streak เชื้อไว้ ถ้าเกิดผลึกสีขาวทึบแสง กระจายตามรอยที่ streak เชื้อไว้แสดงว่าเชื้อมีกิจกรรมของ lipolytic activity เปลี่ยน tween-80 เป็นผลึกสีขาวของสบู่ (soap bubble)

1.5.3 การจำแนกชนิดเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ด้วย primer จำเพาะบริเวณ 16s rDNA

1.5.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

แยกสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยวิธี miniprepation โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA จนได้โคโลนีเต็มมาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จึงนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยแบ่งเชื้อที่เลี้ยงในอาหารใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติม lysis buffer (40 mM Tris-acetate pH 7.8, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่โดยวัดปริมาตร จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วย chloroform ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกคว่ำหลอดเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ของเหลวแยกชั้นจากนั้น ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตร สกัดซ้ำด้วย

chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตรเท่ากัน ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คัดส่วนใสส่วนบนไปใส่หลอดใหม่ วัดปริมาตรแล้วเติม isopropanol ที่เข้มข้นปริมาตรเท่ากับส่วนใสผสมให้เข้ากันจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร (George *et al.*, 2004)

1.5.3.2 การศึกษาแถบดีเอ็นเอ 16s rDNA

นำ DNA ที่ได้จากข้อ 1.5.3.1 ตรวจสอบด้วยไพรมอร์จำเพาะบริเวณ 16S rDNA ออกแบบจากสายพันธุ์เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ HRI 3811 (PHW 1205; race 1) (Valverde *et al.*, 2007) ขนาด 550 bp โดยเพิ่มปริมาณภายใต้ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ 100 นาโนกรัม ผสมกับ 1x PCR buffer, dNTP, เอนไซม์ *Taq* polymerase, และไพรมอร์ (5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCAG-3' และ 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3') ของ ผสมสารให้เข้ากันโดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วยลำดับปฏิกิริยา ดังนี้

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	45 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72	1 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณ โดยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.6 การรวบรวมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.)

เก็บรวบรวมหนอนใยผักและดักแด้ของหนอนใยผักจากแปลงคะน้าในซึ่งเป็นแปลงเดียวกับแปลงที่เก็บตัวอย่างโรค หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในห้องเลี้ยงแมลงที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 5^{\circ}\text{C}$) โดยนำดักแด้มาใส่รวมกันในกรงพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 30x30 เซนติเมตร ด้านข้างบุด้วยตาข่ายลวดร่อนเป็นตัวเต็มวัยแล้วหลังจากที่ออกมาเป็นตัวเต็มวัย นำสำลีชุบน้ำหวานเจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในกรงเพื่อเป็นอาหารสำหรับตัวเต็มวัย และใส่ต้นกล้าคะน้าอายุประมาณ 1 สัปดาห์ ที่ปลูกไว้ในถาดพลาสติกเพื่อให้ผีเสื้อหนอนใยผักวางไข่ จนกระทั่งหนอนเริ่มฟักออกมาจากไข่ หนอนจะค่อย ๆ ไล่ขึ้นสู่ต้นคะน้า หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนใบคะน้าตามความเหมาะสม (ไตรรัตน์, 2552)

2. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ *P. fluorescens* SP007s

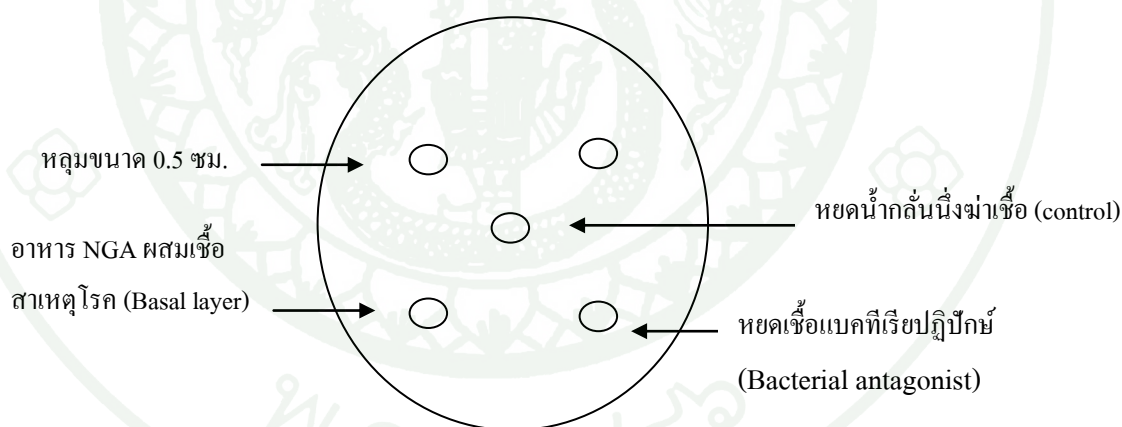
นำเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ซึ่งเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำมา cross streak บนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาทดลอง และขณะเดียวกันเก็บโคโลนีเดียวของ *X. campestris* pv. *campestris* (ที่ได้จากการคัดเลือกและจำแนกชนิดจากข้อที่ 1) และแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ไว้ในกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 40 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพขั้นต่อไป

2.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี agar diffusion method นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ที่มีแนวโน้มในการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ (*X. campestris* pv. *campestris*) โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในอาหารเหลว NGB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเท่ากับ 0.2 OD (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่า

เชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu /มิลลิลิตร) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ micropipette ดูด suspension เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้แห้งให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร อบฆ่าเชื้อแล้วบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NGA ผสมเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำที่เตรียมไว้ (ภาพที่ 3) หยอดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวหน้าอาหารทดสอบ เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งบนอาหาร NGA เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control (สุพจน์, 2545)

$$\text{บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของ cork borer}}{2}$$



ภาพที่ 3 ภาพผังการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ในยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ด้วยวิธี agar diffusion

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพภายใต้สภาพเรือนทดลอง

2.2.1 การเตรียมเชื้อปฏิภักษ์และเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิภักษ์ *P. fluorescens* SP007s และเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำในอาหารเหลว NGB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่น suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 OD (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) เพื่อนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพภายใต้สภาพเรือนทดลองต่อไป

2.2.2 การวางแผนการทดลองและการเตรียมค่น้ำทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) โดยปลูกค่น้ำขอดได้หวัน พันธุ์บางบัวทอง 35 ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ที่บรรจุดินผสมปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของดินร่วน: ดินทราย: ขุยมะพร้าว เท่ากับ 2:1:1 หยอดเมล็ดค่น้ำกระถางละ 3 เมล็ดเมื่อมีอายุ 7 วัน ถอนแยกให้เหลือกระถางละ 1 ต้น โดยให้ปุ๋ยเมื่อค่น้ำอายุ 15 และ 45 วัน (ใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 1 กรัม ต่อค่น้ำ 1 กระถาง) ซึ่งมีกรรมวิธีการปลูกดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเมล็ดค่น้ำและพ่นใบ 3 ครั้ง ที่ค่น้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (sterile water)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเมล็ดค่น้ำด้วย copper hydroxide (1 กรัม: เมล็ดค่น้ำ 1 กิโลกรัม) และพ่นใบด้วย copper hydroxide (10 กรัม: น้ำ 20 ลิตร) ที่ค่น้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเมล็ดค่น้ำ ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิภักษ์ *P. fluorescens* SP007s (10 มิลลิลิตร : เมล็ดค่น้ำ 1 กิโลกรัม)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเมล็ดค่น้ำด้วยเชื้อ *P. fluorescens* SP007s (10 มิลลิลิตร : เมล็ดค่น้ำ 1 กิโลกรัม) และพ่นด้วยเชื้อ *P. fluorescens* SP007s (10 มิลลิลิตร : ค่น้ำ 1 ต้น) ที่อายุ 14 21 และ 28

กรรมวิธีที่ 5 ฟันใบคะน้ำด้วยเชื้อ *P. fluorescens* SP007s (10 มิลลิลิตร : คะน้ำ 1 ต้น)
เมื่อคะน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน

เมื่อคะน้ำอายุ 29 วัน ตรวจสอบและประเมินผลการทดลองออกเป็น 2 ลักษณะ

1. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าคะน้ำ
2. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ในการควบคุมโรคเน่าดำ แบ่งคะน้ำออกเป็น 2 กลุ่มในแต่ละกรรมวิธี โดยกลุ่มที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* เมื่อคะน้ำอายุ 29 วัน (เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ที่เตรียมในข้อ 2.2.1 ฟันใบปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อ คะน้ำ 1 ต้น) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ปลูกเชื้อโรค

2.2.3 การบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์

ประเมินผลข้อมูลตามการทดสอบที่ 1 การเจริญเติบโตของผักคะน้ำที่อายุ 14 และ 30 วัน โดยวัด ความสูง ความกว้างใบ และความยาวใบ จากการสุ่มตัวอย่างต้นคะน้ำจำนวน 10 ต้น ต่อซ้ำต่อกรรมวิธี เพื่อกำหนดค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตโดยใช้สมการ Growth parameter

$$\text{Growth parameter} = \frac{(\text{ความสูงลำต้น} + \text{น้ำหนักสด} + \text{ความยาวใบ} + \text{ความกว้างใบ})}{4}$$

4

ตามวิธีการของ Delahaut, (1997) และข้อมูลความสัมพันธ์ของปริมาณและคุณภาพของผลผลิตคะน้ำในระยะการเก็บเกี่ยวที่ อายุ 65 วัน โดยทำการสุ่มคะน้ำจำนวน 100 ต้นต่อซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโตของคะน้ำ ได้แก่ ความสูง ความกว้างลำต้น ความยาวใบ และน้ำหนักสด

ประเมินข้อมูลการทดสอบประสิทธิภาพที่ 2 โดยสุ่มตัวอย่างใบคะน้ำที่แสดงอาการโรคเน่าดำ ต้นละ 3 ใบ คือ ใบล่าง ใบกลาง และใบบน โดยประเมินระดับการเกิดโรค (disease incidence) โดยนับต้นที่เป็นโรค และระดับความรุนแรง (disease severity) ของโรคที่ปรากฏในแต่ละกรรมวิธีหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีการ วิลาวรรณและคณะ (2549) ตามรายละเอียดในข้อ 1.4

ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนรวม และค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (ชูศักดิ์, 2551)

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก

ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ที่เตรียมไว้ (จากข้อ 1.6) และค่น้ำอายุ 30 วัน ที่ปลูกโดยผ่านการคลุมเมล็ดและพ่นใบเมื่อค่น้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ซึ่งมีทั้งหมด 3 กรรมวิธีเปรียบเทียบ คือ 1.การใช้น้ำกลั่น 2.การใช้เชื้อ *P. fluorescens* SP007s (ที่ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml, 10 มิลลิลิตร : ค่น้ำ 1 ต้น) และ 3.การใช้สารเคมี cypermethrin (10 มิลลิลิตร : ค่น้ำ 1 ต้น) โดยนำไปที่ได้จากการปลูกมาทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการและทดสอบในสภาพเรือนทดลองโดยประเมินประสิทธิภาพ 3 ด้าน คือ ประสิทธิภาพการฆ่าแมลง (Insecticide activity) ประสิทธิภาพในการยับยั้งการกินอาหารของแมลง (Antifeedant activity) และประสิทธิภาพการยับยั้งการวางไข่ และการออกลูกของแมลง (Antioviposition activity)

2.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงในห้องปฏิบัติการการ

ทำการทดสอบแบบไม่ให้ทางเลือกอื่นโดยวิธีจุ่มใบ (leaf-dipping method) โดยตัดใบค่น้ำเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร หรือเท่ากับกันด้วยเลื่อยแมลง นำชิ้นใบค่น้ำไปจุ่ม suspension ของ *P. fluorescens* SP007s) นาน 10 วินาที ผึ่งใบให้แห้ง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีจุ่มใบ (cypermethrin) แล้วในด้วยเลื่อยแมลงที่ใส่กระดาษฟางชุบน้ำไว้กันด้วย เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ชิ้นใบค่น้ำ เขี่ยหนอนวัย 2 ลงบนชิ้นใบค่น้ำ ใบละ 5 ตัว ทดสอบ 20 ซ้ำ ต่อ ความเข้มข้น (1×10^8 cfu/ml ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อใบค่น้ำ 1 ใบ) (50 ตัว ต่อ ความเข้มข้น) บันทึกอัตราการตายของหนอนหลังทำการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าอัตราส่วน โดยใช้สมการวิเคราะห์ (ไตรรัตน์, 2552)

$$AFI = (C - T) / (C + T) \times 100$$

เมื่อ C = % การกินในชุดที่ใช้น้ำกลั่น/สารเคมี/เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

T = % การกินในชุดทดลอง

2.3.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการวางไข่ของหนอนใยผักบนพืชอาหาร (Antioviposition activity) ภายใต้ห้องปฏิบัติการ

ทดสอบแบบให้ทางเลือก (choice test) โดยเพาะกล้าคะน้าในถ้วยพลาสติก ซึ่งรองภายในด้วย กระดาษทิชชูเปียก เมื่ออายุครบ 7 วัน ถอนต้นกล้าคะน้าทิ้งจนเหลือถ้วยละ 15 ต้น นำ suspension *P. fluorescens* SP007s (ที่เตรียมในข้อ 2.2.1) พ่นลงบนต้นกล้าคะน้า ถ้วยละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดสเปรย์ขนาดเล็ก หลังจากนั้นนำต้นกล้าที่พ่นด้วยน้ำเปล่า 1 ถ้วยเป็นชุดควบคุม ปลอ่ยฝีเสื้อหนอนใยผักที่เพิ่งออกเป็นตัวเต็มวัยใหม่ ๆ ในกรง ๆ ละ 20 คู่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้พืชและแมลง ต่างชุดกัน ทั้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับจำนวนไข่และทำการทดสอบ เช่นเดียวกับคะน้าอายุ 30 วัน ในสภาพเรือนทดลอง แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า Effective repellency (%ER) และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ไตรรัตน์, 2552)

$$ER (\%) = (NC-NT)/NC \times 100$$

เมื่อ NC = จำนวนไข่ในชุดควบคุม
NT = จำนวนไข่ในชุดทดลอง

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s

พัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ที่ประกอบไปด้วย เซลล์ *P. fluorescens* SP007s สารพาและ สารเสริมประสิทธิภาพในรูปผลิตภัณฑ์สูตรผง เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้และการเก็บรักษา

3.1 อาหารเพิ่มปริมาณเซลล์ *P. fluorescens* SP007s

3.1.1 การศึกษาชนิดและองค์ประกอบอาหาร

คัดเลือกชนิดพืชและแหล่งของธาตุพืชต่าง ๆ ที่คาดว่าจะสามารถใช้เป็นแหล่งของ

พลังงานที่ให้คาร์บอน (คาร์โบไฮเดรต) ได้แก่ มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวเปลือก ข้าวสาลี และข้าวเหนียว และแหล่งของไนโตรเจน (กรดอะมิโน) ได้แก่ ถั่วแดง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง โดยเบื้องต้นนำเชื้อพืชดังกล่าวอย่างละ 10 กรัม ผสมน้ำ 200 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำน้ำสารกรองส่วนของเหลว มาทดสอบโดยนำ suspension ของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว NGB ที่ 0.2 OD (10^8 cfu/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อในน้ำสารกรองเหลวดัดแปลงเพิ่มปริมาณดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนผสมอาหารเพิ่มปริมาณเซลล์

คัดเลือกตัวแทนน้ำต้มพืชและเมล็ดธัญพืชที่มีแนวโน้มเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ในอัตราส่วนเริ่มต้น คือ 1:1, 1:0.5, 1:0.25 และ 1:0 เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏได้อย่างรวดเร็วเปรียบเทียบกับอาหารดัดแปลง MS (ชัยสิทธิ์ และ สุดฤดี, 2548) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป NGB และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ King's medium B โดยอาหารแต่ละชนิดผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำ suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงวัดเชื้อที่ 0.2 OD (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 cfu / มิลลิลิตร) เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลวดัดแปลงแต่ละชนิด

3.1.3 การศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์

เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อกำหนดเป็นวิธีการมาตรฐานสำหรับเลี้ยงขยายหรือเพิ่มปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s โดยเลี้ยงเชื้อสูตรที่พัฒนาและคัดเลือกจากข้อ 3.1.2 เป็นสภาวะตั้งต้นและปรับสภาพการเลี้ยงดังนี้

3.1.3.1 ศึกษาสภาพการเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

โดยการใช้ 1 N HCL และ 1 N NaOH ปรับ pH เริ่มต้นที่ระดับ 6-7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ดังกล่าว เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง เลี้ยงเชื่อนาน 24 ชั่วโมง

3.1.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์

โดยนำอาหารชนิดใหม่ที่มีปรับ pH เลี่ยงที่อุณหภูมิควบคุมที่แตกต่างกัน คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เลี่ยงเชืบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง เลี่ยงเชื่อนาน 24 ชั่วโมง

3.1.4. การประเมินผลการทดลอง

ประเมินผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าปฏิบัติด้วยวิธี 10 fold dilution method นำอาหารชนิดใหม่มาศึกษาคุณสมบัติที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เปรียบเทียบกับอาหารดัดแปลง MS อาหารเลี่ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป NGB และอาหารเลี่ยงเชื้อจำเพาะ KB medium

3.2 ชนิดสารพาและส่วนผสมของผลิตภัณฑ์

3.2.1 การเตรียมเชื้อ *P. fluorescens* SP007s

เตรียมเซลล์ *P. fluorescens* SP007s เพื่อผสมกับสารพา โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ *P. fluorescens* SP007s เลี่ยงในอาหารเพิ่มปริมาณชนิดใหม่ที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาณ 1 ลิตร เลี่ยงเพิ่มปริมาณโดยเขย่าข้ามคืนนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทิ้งส่วนใสและนำเซลล์ที่ได้ วัดเชื้อที่ 0.6 OD (ทดสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งหมื่นเท่าแล้ว plate บนอาหาร NGA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3×10^{13} cfu /มิลลิลิตร) เพื่อนำไปผสมกับสารพาในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมโรค

3.2.2 การคัดเลือกชนิดของสารพา

ประเมินคุณสมบัติสารพาชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกชนิดที่มีคุณสมบัติในการกระจายตัวในน้ำได้ดี และเป็นที่ยึดเกาะของแบคทีเรียปฏิบัติได้ดีโดยมีอัตราส่วนผสม ดังตารางที่ 2 เป็นสารพาสำหรับนำไปผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์สูตรผง ประเมินประสิทธิภาพคุณสมบัติการเป็นสารพา 4 ด้าน คือ

1. ความสามารถของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ในการอยู่ร่วมกับสารพา (Viability)

นำสารพาที่ผสมเชื้อ *P. fluorescens* SP007s มาทดสอบความสามารถในการอยู่ร่วมกับสารพา โดยเก็บรักษาสารพาดังกล่าวที่อายุการเก็บรักษานาน 6 เดือน ในช่องพลาสติกที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง (28 ± 5 °C) ประเมินผลโดยตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี 10 fold dillution ใช้ไมโครไปเปตปลดเชื้อสด suspension เชื้อที่ 4 ระดับการเจือจางคือ 10^8 10^{10} 10^{12} และ 10^{14} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NGA แล้วทำการกระจาย (space plate) ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารและนำมาคำนวณเป็นค่า cfu/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 สารพาที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s

สารพา ^{1/}	อัตราส่วน(กรัม)
1. Talcum	100
2. Kaolin	100
3. Powder potato	100
4. Lime	100
5. Dolomite	100
6. Powder milk	100
7. Talcum + Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70:10:10:10
8. Kaolin + Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70: 10:10:10
9. Powder potato + Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70: 10:10:10
10. Lime + Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70: 10:10:10
11. Dolomite + Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70: 10:10:10
12. Powder milk+ Deshefix ^{2/} + SiO ₂ + CaSO	70: 10:10:10

^{1/} อัตราส่วนผสมสารพาจะต้องผสมเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลอง

^{2/} สาร Deshecofix คือสาร alkylamine ethoxylates มีคุณสมบัติในการช่วยในการแพร่กระจายสารพา

2. ลักษณะการละลายน้ำของจุลินทรีย์ผสมสารพา (Dissolution)

ประเมินตามวิธีการของบริษัทแก้พินคัสตรีย์โดยการจับเวลาความสามารถในการละลาย น้ำหลังผสมน้ำทันที แบ่งการประเมินออกเป็น 5 ระดับโดยจับเวลาการละลายน้ำของสารพา 5 ระดับ คือ

- ระดับที่ 1 เป็นระดับที่ดีที่สุดโดยสารพาละลายน้ำทันทีภายในเวลา 1-5 นาที
- ระดับที่ 2 ระดับดีสารพาละลายน้ำภายในเวลา 5-10 นาที
- ระดับที่ 3 ระดับปานกลางสารพาละลายน้ำภายในเวลา 11-30 นาที
- ระดับที่ 4 ระดับพอใช้สารพาละลายน้ำภายในเวลา 30-60 นาที
- ระดับที่ 5 ระดับที่ต่ำกว่ามาตรฐานสารพาไม่ละลายน้ำ โดยเกาะตัวเป็นกลุ่มด้านบนผิวน้ำ

3. ลักษณะการแขวนลอยของจุลินทรีย์ผสมสารพา (Suspension)

ประเมินตามวิธีการของบริษัทแก้พินคัสตรีย์โดยนำสารพาผสมกับน้ำแล้วนำไปเขย่า ด้วยเครื่อง vortex นาน 5 นาที ที่ 150 รอบต่อนาที แล้วประเมินออกเป็น 5 ระดับ คือ

- ระดับ 1 คือ สารพาแขวนลอยและตกตะกอนหมดภายในเวลา 12 ชั่วโมง (ดีที่สุด)
- ระดับ 2 คือ สารพาแขวนลอยและตกตะกอนหมดภายในเวลา 30-60 นาที (ดี)
- ระดับ 3 คือ สารพาแขวนลอยและตกตะกอนหมดภายในเวลา 11-30 นาที (ปานกลาง)
- ระดับ 4 คือ สารพาแขวนลอยและตกตะกอนหมดภายในเวลา 5-10 นาที (พอใช้)
- ระดับ 5 คือ สารพาแขวนลอยและตกตะกอนหมดภายในเวลา 1-5 นาที (แย)

4. ลักษณะการจับใบของจุลินทรีย์ผสมสารพา (Sticker)

นำสารพาดังกล่าว 10 กรัม ละลายน้ำ 20 ลิตร พ่นใบคะน้ำที่มีขนาดความกว้างใบ 6 เซนติเมตร และความยาวใบ 12 เซนติเมตร ฟังลมให้แห้ง 6 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างใบด้วยน้ำกลั่นหนึ่ง มาเชื้อ ตรวจสอบปริมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ด้วยวิธี 10-fold dilution method แล้วเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในสารพาแต่ละชนิด

3.2.3 สารเสริมประสิทธิภาพ (Adjuvant) และแหล่งอาหาร (Substrate)

คัดเลือกชนิดสารอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เพื่อเสริมประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย
 ปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007 โดยคัดเลือกระหว่างกลูโคส ซูโครส แลคโตส น้ำตาลเดกโตส
 caboxymethyl cellulose (CMC) ผง FeSO_4 ผสมกับสารพาที่ดีที่สุด ที่คัดเลือกจากข้อ 4.2.1 และผสม
 ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 3×10^{13} cfu/มิลลิลิตร
 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบระหว่างสารพา สารอาหาร และสารเสริมประสิทธิภาพ

สารพา	สัดส่วน
1. สารพา : น้ำตาลกลูโคส	70 : 10
2. สารพา : น้ำตาลซูโครส	70 : 10
3. สารพา : น้ำตาลทรายแดง	70 : 10
4. สารพา : น้ำตาลแลคโตส	70 : 10
5. สารพา : น้ำตาลกลูโคส : CMC : FeSO_4	70 : 10 : 1:1
6. สารพา : น้ำตาลซูโครส : CMC : FeSO_4	70 : 10 : 1:1
7. สารพา : น้ำตาลทรายแดง : CMC : FeSO_4	70 : 10 : 1:1
8. สารพา : น้ำตาลแลคโตส : CMC : FeSO_4	70 : 10 : 1:1

ประเมินประสิทธิภาพสารพาที่ผสมกับสารเสริมประสิทธิภาพและเชื้อปฏิบัณ 4 ด้าน คือ

1. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของน้ำ

โดยนำส่วนผสมที่ได้มาคลุกเคล้าทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต
 โดยปลูกกะน้ำด้วยวิธีการที่ดีที่สุดที่คัดเลือกจากข้อ 2 ด้วยสารผสมดังกล่าว ประเมินการเจริญเติบโต
 ของกะน้ำที่อายุกะน้ำ 65 วัน โดยวัดการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

2. การควบคุมโรคเน่าดำ

ทำการปลูกกะน้ำโดยคลุกเมล็ดกะน้ำก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมสารดังกล่าว เมื่อกะน้ำอายุ 29 วัน ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ประเมินการเกิดโรค และความรุนแรงโรค เช่นเดียวกับข้อ 1.4

3. การควบคุมหนอนใยผัก

ปลูกกะน้ำโดยการคลุกเมล็ดและพ่นใบเมื่อกะน้ำอายุ 14 27 และ 28 วัน โดยนำใบกะน้ำที่อายุ 30 วันทำการทดสอบแบบไม่ให้ทางเลือกโดยวิธีจุ่มใบ โดยตัดใบกะน้ำเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร หรือเท่ากับกันด้วยเลียงแมลง นำชิ้นใบกะน้ำไปจุ่ม suspension *P. fluorescens* SP007s นาน 10 วินาที ผึ่งใบให้แห้ง หลังจากนั้นวางชิ้นใบที่จุ่มเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี cypermethrin เลียงแมลงที่ไล่กระดาษฟางชุบน้ำไว้กันด้วย เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ชิ้นใบกะน้ำ เชื้อหนอนวัย 2 ลงบนชิ้นใบกะน้ำ ใบละ 5 ตัว ทดสอบ 20 ซ้ำ ต่อ ความเข้มข้น (50 ตัว ต่อ ความเข้มข้น) บันทึกอัตราการตายของหนอนหลังทำการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง

4. การคงความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ (Viability)

โดยเก็บผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่พัฒนารักษานาน 12 เดือน ในช่องพลาสติกที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง ($28 \pm 5^{\circ}\text{C}$) ประเมินผลโดยการตรวจสอบการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s ในสารผสมโดยวิธี plate counting ด้วยการ 10 fold dilution method วิเคราะห์ข้อมูลหาความแปรปรวน และค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's New Multiple Range test (DMRT) โปรแกรมคอมพิวเตอร์ R. 2.8.0 (ชูศักดิ์, 2551)

3.3 การหาสัดส่วนสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพที่เหมาะสม

นำสารพาที่คัดเลือกจากข้อ 3.1 และสารเสริมประสิทธิภาพจากข้อ 3.2 มาหาอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยผสมเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (3×10^{13} cfu/ มิลลิลิตร) โดยประเมินผลการทดลองความสามารถในการอยู่รอด ความสามารถในการละลายน้ำ ความสามารถในการแขวนลอย การควบคุมโรคเน่าดำ และการควบคุมหนอนใยผัก โดยจะปรับอัตราส่วนตามการละลายน้ำ และการแขวนลอยเป็นตัวตั้งต้น

3.4 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดผง *P. fluorescens* SP007s ชนิดเดิม (ISR-P®) กับผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่

นำผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ใหม่ที่ได้จากข้อ 3.3 มาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ชนิดเดิมที่มีรายงานการควบคุมโรคหลายชนิด (Pathuangwong *et al.*, 2009) โดยประเมินประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับการทดสอบสารเสริมประสิทธิภาพการเป็นสารพาในข้อ 3.2.2 และคุณภาพการเป็นสารเสริมประสิทธิภาพ 3.2.3 และวิเคราะห์ความแตกต่างตามข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติ โดย Duncan's New Multiple Range test (DMRT) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (ซุสัคคี, 2551)

4. การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

4.1 ประสิทธิภาพภายใต้สภาพเรือนทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดที่พัฒนามาจากข้อ 3 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และแมลงศัตรูพืชภายใต้สภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ ISR-P® เดิม

4.1.1 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ใหม่ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคเน่าดำ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยปลูกคะน้ายอดใต้หวน พันธุ์บางบัวทอง 35 ลงในกระถางพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ที่บรรจุดินผสมปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของดินร่วน: ดินทราย: ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 2:1:1 หยอดเมล็ดกระถางละ 3 เมล็ด ถอนแยกเมื่อคะน้าอายุ 7 วัน ถอนให้เหลือกระถางละ 1 ต้น หลังจากคะน้างอก โดยให้ปุ๋ยยูเรียอัตรา 1 กรัม ต่อคะน้า 1 กระถางซึ่งมีกรรมวิธีการปลูกดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการพัฒนาในข้อ 3 ที่มีอายุผลิตภัณฑ์ 1 เดือน

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ผลิตภัณฑ์ ISR-P® จากภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรรมวิธีที่ 3 ใช้สารเคมีที่มีส่วนผสม copper hydroxide

กรรมวิธีที่ 4 ใช้น้ำกลั่นในการควบคุม

กรรมวิธีที่ 5 ใช้ Fresh cell SP007s (1×10^8 cfu/ml)

ตรวจสอบและประเมินผลประสิทธิภาพการทดลองออกเป็น 2 ลักษณะ คือ
ทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ซึ่งใช้วิธีการ
ตรวจสอบและประเมินผลเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

4.1.2 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ใหม่ในการควบคุมหนอนใยผัก

วางแผนการทดลองแบบ CRD และปลูกต้นคะน้าเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ซึ่งมี
กรรมวิธีทั้งหมด 4 กรรมวิธี คือ 1.ใช้ผลิตภัณฑ์จากข้อ 3 ที่พัฒนาขึ้นใหม่ 2.ใช้ผลิตภัณฑ์ ISR-P®
จากภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3.ใช้สารเคมีควบคุมหนอนใยผัก
cypermethrin และ 4.ควบคุมด้วยน้ำเปล่า (sterile water) และ 5. ควบคุมด้วย Fresh cell SP007s
(1×10^8 cfu/ml) โดยใช้กรรมวิธีที่ดีที่สุดจากข้อ 2 และนำไปคะน้า 30 วันมาทดสอบประสิทธิภาพใน
การควบคุมหนอนใยผักเช่นเดียวกับข้อ 2.3

4.2 การประเมินประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคและ
แมลงในสภาพไร่

วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) บนพื้นที่แปลง
ปลูกขนาด 1 ไร่ ที่ตำบลบ้านพราน จังหวัดอ่างทองโดยการไถพรวน 1 ครั้ง ปลูกคะน้าโดยการหว่าน
เมล็ดคะน้า 5 กรัม ต่อพื้นที่ 2×3 ตารางเมตร ให้น้ำแบบพ่นฝอยทุก 1-2 สัปดาห์ กำจัดวัชพืชโดย
การพ่นสารเคมีก่อนงอก 1 ครั้ง (10 ซีซี: น้ำ 1 ลิตร) และใช้แรงงานถอนมือ กรรมวิธีในการ
ทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้พื้นที่ ขนาด 3×7 ตารางเมตร การเตรียมดิน การให้น้ำ และปุ๋ย
ปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการของเกษตรกร ทำการทดสอบในสภาพไร่ โดยใช้กรรมวิธีที่ดีที่สุดจากการ

ทดลองในข้อที่ 2 เพื่อนำมาทดสอบผลิตภัณฑ์ทั้ง 5 กรรมวิธีในสภาพไร่ โดยใช้กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาใหม่จากข้อ 3

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ผลิตภัณฑ์ ISR-P® จากภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ copper hydroxide (Funguran®) ในอัตรา 10 กรัม ต่อ น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ใช้วิธีที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่เดิม โดยการใช้ น้ำหมักสลับกับ cabendazim

กรรมวิธีที่ 5 ใช้น้ำในการควบคุมเปรียบเทียบ

ตรวจสอบและประเมินผลประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงเช่นเดียวกับ การประเมินโรคและแมลงในข้อ 2.2.2 และ 2.3

5. การศึกษากลไกการชักนำภูมิต้านทานพืช

ทำการเก็บค่น้ำที่ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคและแมลง ภายใต้สภาพโรงเรือน และสภาพไร่ เพื่อมาตรวจสอบสารชักนำภูมิต้านทาน superoxide dismutase และ glucosinolate ในค่น้ำโดยเก็บใบค่น้ำทุกอายุ 7 วัน และเก็บทุกวันหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคและปล่อย หนอนใยผักทดสอบลงไปเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเก็บใบค่น้ำมา 10 กรัม และเก็บใน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทันทีเพื่อมาทำปฏิกิริยา โดยจะตรวจสอบสารชักนำภูมิต้านทานในค่น้ำที่ได้จากการทดสอบ cell suspension จากข้อ 2.2.2 และ 2.3 และค่น้ำที่ได้จากการทดสอบการใช้ผลิตภัณฑ์ ชนิดใหม่ จากการทดสอบประสิทธิภาพในข้อ 4

5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของ superoxide dismutase (SOD) ในค่น้ำ

ศึกษาวิเคราะห์อัตราการสะสมและกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) โดยนำตัวอย่างใบคะน้า กรรมวิธีละ 3 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นนำมาผสมกับ homogenization buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที) นำส่วนใสปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรเก็บไว้ และดูด suspension 200 ไมโครลิตร มาผสมกับ riboflavin solution 800 ไมโครลิตร นำไปวางใต้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ 15 วัตต์ นาน 10 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อแสงไฟผ่านถูกตัวอย่าง อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วิเคราะห์จากการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าโดยใช้สมการ standard curve ตามวิธีการดัดแปลงของ Hammerschmid *et al.* (1982)

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร glucosinolate

5.2.1 การสกัดสาร glucosinolate จากคะน้า

นำตัวอย่างใบคะน้าบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ละเอียดเป็นผงแป้งจากนั้นบรรจุลงในหลอดแก้ว เติม methanol 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วางหลอดแก้วลงใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และเติม benzylglucosinolate เป็น internal standard ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปทันที หลังจากนั้น 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใสที่เหลือนำกลับไปสกัดด้วย methanol ซ้ำอีก 2 ครั้งแล้วนำส่วนใสที่ได้มาผสมกันในหลอด นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน syringe column ที่มี 0.3 มิลลิลิตร DEAE Sephadex A-25 ทั้งส่วนใสและน้ำสาร sulfatase ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ตามลงไป ใน syringe column ที่มีสารติดอยู่ หลังจากนั้นปิด syringe column ทันที จนครบระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาล้าง syringe column โดยล้าง 3 ครั้ง แล้วเก็บน้ำที่ล้างมา 1 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Craig and Sam. (2002)

5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร glucosinolate

นำที่ glucosinolate ที่แยกจากคะน้าในข้อ 5.2.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณสาร glucoiberin และ สาร sinigrin ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสาร glucosinolate โดยใช้ column C-18 ODS

reverse-phase column (250x4.6 mm. I.D., 5 μ m, Luna Phenomenex, IL) ที่ wavelength 229 นาโนเมตร อุณหภูมิของ column เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส อัตรา flow rate เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที โดย retention time เท่ากับ 15 นาที อัตราส่วนของ mobile phase ใช้ น้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ tetrabutylammoniumhydroxide ต่อ acetonitrile 20 เปอร์เซ็นต์ โดยระดับ solvent คงที่ 5 นาที และก่อนจบ 5 นาที โดย linear gradient ใช้ 100 เปอร์เซ็นต์น้ำ ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวนและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R.2.8.0 (ซุสศักดิ์, 2551)

6. สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
2. ศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลางคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
3. บริษัท แก๊พอินดัสตรี จำกัด ตำบลบางโพ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี
4. แปลงผลิตค่น้ำของเกษตรกร ตำบลบ้านพราน อำเภอแสวงหา จังหวัดอ่างทอง

7. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มตั้งแต่เดือน เมษายน พ.ศ. 2552 ถึง กันยายน พ.ศ. 2553

ผลและวิจารณ์

ผล

1. สายพันธุ์เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำและหนอนใยผัก *Plutella xylostella* ของคะน้า

1.1 เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำและการแยกเชื้อสาเหตุ

จากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ที่แสดงลักษณะอาการโรคเน่าดำ จากแหล่งผลิตคะน้าที่สำคัญรวม 4 จังหวัด คือ นนทบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี และอ่างทอง โดยเก็บตัวอย่างพืชจากลักษณะพืชที่ผิดปกติที่ปรากฏ (Rimmer *et al*, 2006) ที่มีลักษณะอาการขอบใบเริ่มเหลืองลุกลามเข้าภายในเส้นกลางใบเป็นรูปตัววี และเส้นใบมีลักษณะเป็นสีดำ โดยเก็บรวบรวมใบคะน้าที่มีลักษณะดังกล่าว ได้ทั้งหมด 191 ตัวอย่าง จากจังหวัด นนทบุรี 65 ตัวอย่าง ปทุมธานี 36 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 47 ตัวอย่าง และอ่างทอง 43 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ *X.campestris* pv. *campestris* จากตัวอย่างทั้งหมด 191 ตัวอย่างด้วยวิธี tissue transplanting พบว่าสามารถแยกออกเป็นโคโลนีสีเหลืองเดี่ยว ๆ ที่มีแนวโน้มเป็น *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ เท่ากับ 175 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4)

1.2 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน

การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลัน (hypersensitive response: HR) โดยนำเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นสาเหตุโรคทั้ง 175 สายพันธุ์ทดสอบปฏิกิริยาHR บนต้นยาสูบเพื่อยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค ผลการทดลองพบว่าเชื้อสาเหตุโรคที่แยกมาทั้งหมด 175 สายพันธุ์ พบ 125 สายพันธุ์ เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อใบยาสูบเกิดปฏิกิริยาเซลล์ตายอย่างเฉียบพลัน มีลักษณะแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรค แสดงว่าเชื้อ 125 สายพันธุ์นั้นมีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุโรคเนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบจึงเป็นการยืนยันระดับหนึ่งว่าเชื้อ 125 สายพันธุ์ ที่แยกจากใบพืชที่เป็นโรคนั้นเป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำจริง โดยพบว่าเชื้อ 9 สายพันธุ์ คือ Brn 16, Brn 43, Brn 56, Brp13, Brp 27, Brs 24, Brs 39 Bra 10

และ Bra 17 ทำให้เซลล์ไบบาสุบตายอย่างเฉียบพลันภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีด suspension เชื้อสาเหตุโรค

1.3 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเน่าดำ

นำเชื้อ 125 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบว่าเกิดปฏิกิริยา HR บนต้นยาสูบมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย (คะน้า) ด้วยวิธีการ Koch's postulation ผลการทดลองพบว่าลักษณะอาการที่เกิดขึ้นหลังจากปลูกเชื้อมีลักษณะเช่นเดียวกับการเกิดโรคในธรรมชาติ โดยอาการจะเริ่มเหลืองและแห้งตายบริเวณขอบใบแล้วค่อยลามลึกเข้ามาในเนื้อใบตามแนวเส้นใบที่อยู่ระดับเดียวกันจนจรดแกนกลางของใบ ทำให้เกิดอาการเหลืองหรือแห้งเป็นสีน้ำตาลลักษณะรูปตัววี (V-shaped) ซึ่งเป็นลักษณะอาการพิเศษเฉพาะของโรคนี้ โดยพบว่า 125 สายพันธุ์ จะค่อยๆ ปรากฏอาการชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อได้ 7-12 วัน โดยในสายพันธุ์เชื้อที่แสดงอาการโรครุนแรงซึ่งมีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้น (Brn 43 Brp 13 Brs 39 และ Bra17) จะเห็นอาการหลังปลูกเชื้อภายใน 3 วัน สังเกตเห็นได้ชัดเจนว่าเชื้อจะเข้าไปเจริญอยู่ที่เส้นก้านใบ เมื่อนำใบเหล่านี้ส่องผ่านแสงหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์จะพบว่าเส้นใบมีสีดำ หรือเมื่อนำมาตัดส่วนของลำต้นหรือผ่าออกตามขวางจะเห็นส่วนของท่อน้ำของคะน้าเน่าเป็นสีดำ

1.4 การจำแนกคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และโมเลกุล ของเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris*

การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ โดยนำเชื้อทั้งหมดที่ผ่านการพิสูจน์โรคด้วย การทดสอบปฏิกิริยา hypersensitive response และวิธี Koch's postulation ทั้ง 125 สายพันธุ์ มาจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ในระดับสรีรวิทยา พบว่ามีลักษณะโคโลนีของเชื้อทุกสายพันธุ์บนอาหาร NGA มีโคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะกลมมน ขอบเรียบ ผิวเรียบเป็นมันวาว และเมื่อขยี้มีสีโคโลนี ๆ คดสีแดงของ safanino เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ตรงตามที่ Dye *et al.* (1980) เชื้อทั้งหมดเป็น gram negative ลักษณะเซลล์แบบท่อนสั้น ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ต่างชนิด พบว่าเชื้อสาเหตุโรคทั้งหมด ไม่สามารถใช้กลูโคสในสภาพที่ไม่มีอากาศ สามารถย่อย gelatin, casein, starch และ tween 80 ได้ แต่ไม่สร้าง indole ใน peptone water สามารถสร้างเอนไซม์ catalase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และ urease สร้าง H₂S จาก peptone water สามารถใช้ glucose, arabinose, mannose, lactose, sucrose และ

manitol เป็นแหล่งของพลังงานคาร์บอนได้ โดยทำให้เกิดกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส เมื่อนำผลการทดลองเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. (John *et al.*, 1994) พบว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะของเชื้อเป้าหมาย *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำทุกปฏิกิริยา (ตารางที่ 4) เมื่อจำแนกชนิดเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ Bra17 ด้วย primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ 16S rDNA พบว่า primer ของเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ HRI 3811 (PHW 1205; race 1) (5'CTCGTAGACTGCGTACATGCAG-3'และ GACGATGAGTCCTGACCGA-3') (Valverde *et al.*, 2007) และสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน 16S rDNA ของเชื้อสายพันธุ์ *X. campestris* pv. *campestris* ทั้ง 125 สายพันธุ์ได้โดยใช้ โดยมีแถบ DNA เท่ากับ 550 bp ตรงตามขนาดที่ได้ออกแบบไว้จึงเป็นการยืนยันได้ว่าและเป็นเชื้อสาเหตุโรคจริง (ภาพที่ 5)

1.5 การเก็บรวบรวมหนอนไผ่

การเก็บรวบรวมแม่พันธุ์ของหนอนไผ่จากแหล่งปลูกที่เดียวกับแหล่งที่เก็บเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำและนำมาเลี้ยงไว้ในกล่องและกรงจนเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งมีแม่พันธุ์หนอนไผ่ทั้งหมด 250 ตัว โดยมีลักษณะของตัวเต็มวัยเป็นผิสีออกกลางคืน วางไข่เป็นฟองหรือกลุ่มเล็ก ๆ ไข่มีสีเหลืองอ่อน และจากการเก็บมาจากแปลงมีหนอนวัย 3 และ 4 โดยหนอนจะมีลักษณะลำตัวยาวเรียวยาว หัวท้ายแหลม ส่วนท้ายมีปุ่มยื่นออกเป็น 2 แฉก สีเขียวอ่อน หรือเขียวปนเหลือง เมื่อถูกตัวหนอนจะคืนและทิ้งตัวลงดินโดยการชักใย เข้าดักด้วโดยมีใยปกคลุม เลี้ยงไว้เพื่อที่จะนำรุ่นลูกรุ่นถัดไป (F2) ใช้ในการทดสอบ (ภาพที่ 6)

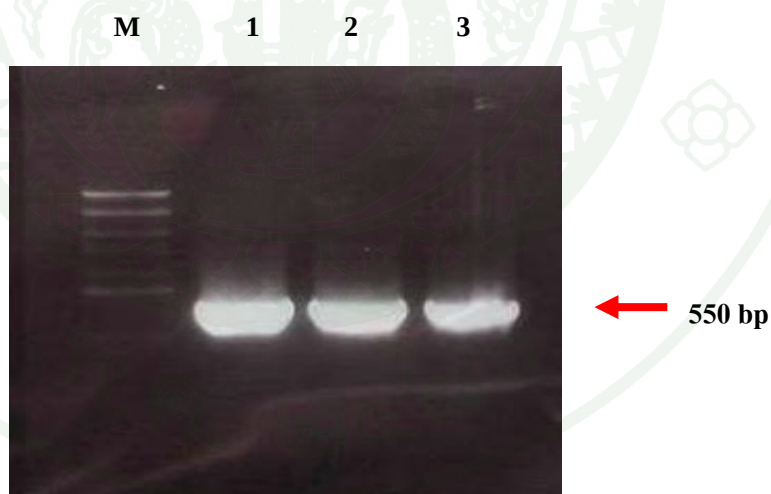
ตารางที่ 4 คุณสมบัติพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคน้ำ
คำคะน้ำ

ลักษณะทดสอบ	ปฏิกิริยา
ลักษณะสีโคโลนี	สีเหลืองนวล กลม ขอบเรียบ มันวาว
การติดสีแกรม	-
การใช้น้ำตาล Manitol	+
การใช้น้ำตาล Glucose	+
การใช้น้ำตาล Arabinose	+
การใช้น้ำตาล Lactose	+
การใช้น้ำตาล Mannose	+
การใช้น้ำตาล Socose	+
การย่อย Gelatin	+
การย่อย Casein	+
การย่อย Starch	+
การย่อย Tween 80	+
การทดสอบ Indole	+

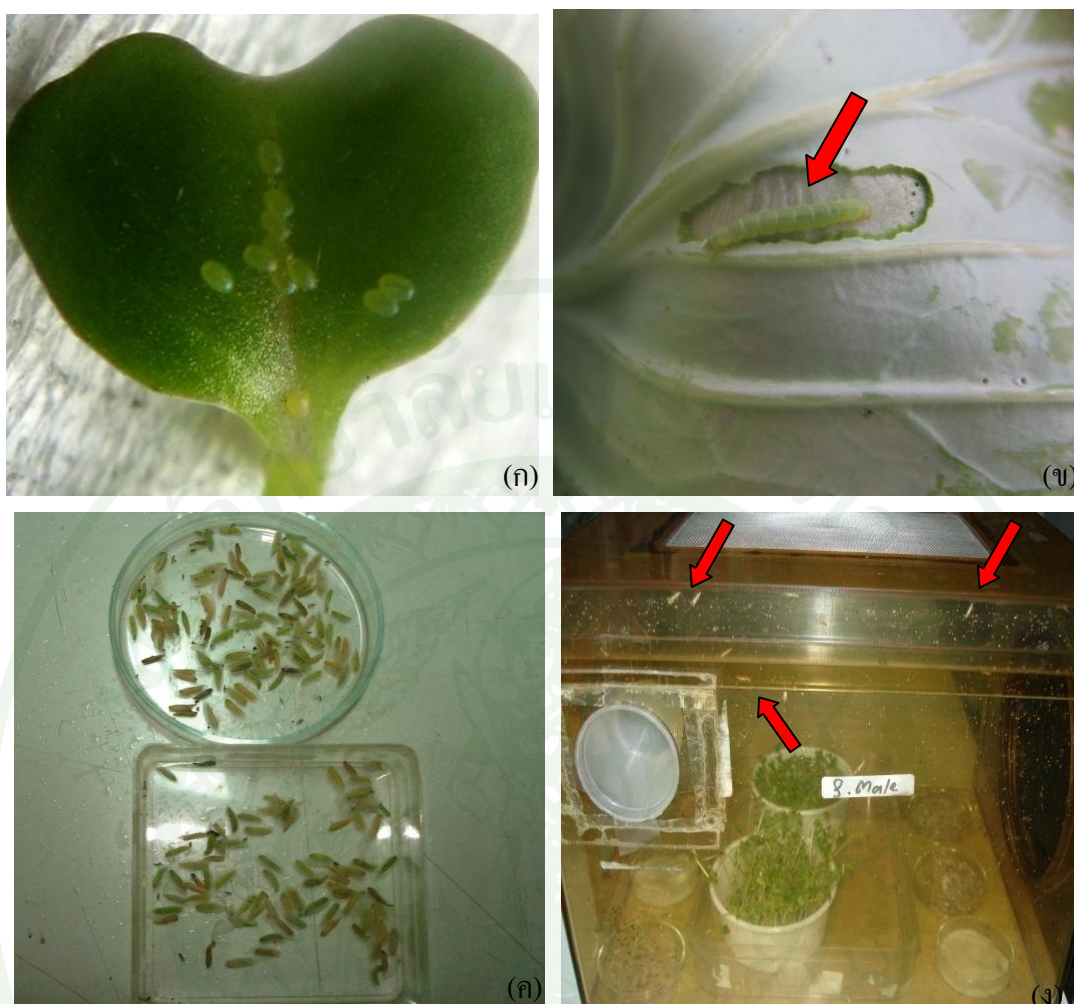
^{1/} + = 90 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่าให้ผลเป็น positive และ - = ไม่เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 4 ลักษณะอาการโรคเน่าดำที่ตุ่มกลามของเชื้อจากขอบใบทำให้ใบเป็นสีเหลือง และตุ่มกลามเข้าสู่เส้นกลางใบทำให้ท่อลำเลียงน้ำและลำเลียงอาหารของพืชมีสีดำ (ก) โดยเชื้อสาเหตุ *X. campestris* pv. *campestris* ที่แยกจากตัวอย่างมีลักษณะโคโรนาสีเหลือง ขอบเรียบ ม้วนวบนอาหาร NGA (ข)



ภาพที่ 5 ผลผลิต PCR ของ 16S rDNA โดย primer จำเพาะขนาด 550 bp บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ช่องที่ M = 1 kb ladder ช่องที่ 1-2 = *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ Bra 17 และ Brp 13



ภาพที่ 6 หนอนใยผัก *Plutella xylostella* มีลักษณะของไข่หนอนมีสีเขียวใสวางไข่แบบฟองเดี่ยว ๆ
 (ก) เจริญเป็นตัวหนอน ซึ่งกินค่น้ำเป็นอาหาร (ข) เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้จะสร้างเส้นใยปกคลุมตัวหนอนสีขาว (ค) และเจริญเป็นผีเสื้อกลางคืนตัวเต็มวัย (ง)

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s

2.1 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าดำ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ที่เก็บรักษาไว้ใน glycerol 20 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงบนอาหาร NGA พบว่าเชื้อมีลักษณะ โคโลนีใส ไม่มีสี และเรืองแสงเมื่อส่องดูภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์และเลี้ยงในอาหาร NGB เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเขียวอ่อน (วิลาวรรณ, 2551) (ภาพที่ 6) และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ King medium B พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเห็นชัดเจนเมื่อดูใต้แสงยูวี (ภาพที่ 7)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ในการควบคุมเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ด้วยวิธี agar diffusion เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี (copper hydroxide) และน้ำกลั่น ปรากฏว่าหลังจากบ่มเชื้อนาน 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s สามารถผลิตสาร secondary metabolite ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำโดยสร้างบริเวณใสกว้าง 1.8 เซนติเมตร (ภาพที่ 7) ในขณะที่การใช้ copper hydroxide มีบริเวณใสเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น ซึ่งไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อโรค

การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นคะน้าโดยการศึกษาเทคโนโลยีในการปลูกซึ่งมีกรรมวิธีดังต่อไปนี้ คือ การใช้เชื้อ SP007s ในลักษณะ cell suspension คลุกเมล็ด คลุกเมล็ดรวมกับการพ่นใบด้วย SP007s โดยจะคลุกเมล็ดด้วย cell SP007s ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 cfu/ml ปริมาตร 10 มิลลิลิตร: เมล็ดคะน้า 1 กิโลกรัม และพ่นใบที่ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml อัตรา 10 มิลลิลิตร: คะน้า 1 ต้น และเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีในการควบคุม และน้ำกลั่นในการควบคุม ผลการทดลองพบว่า เมื่อวัดความสูงต้น น้ำหนักสด ความยาวใบ ความกว้างใบ วิเคราะห์

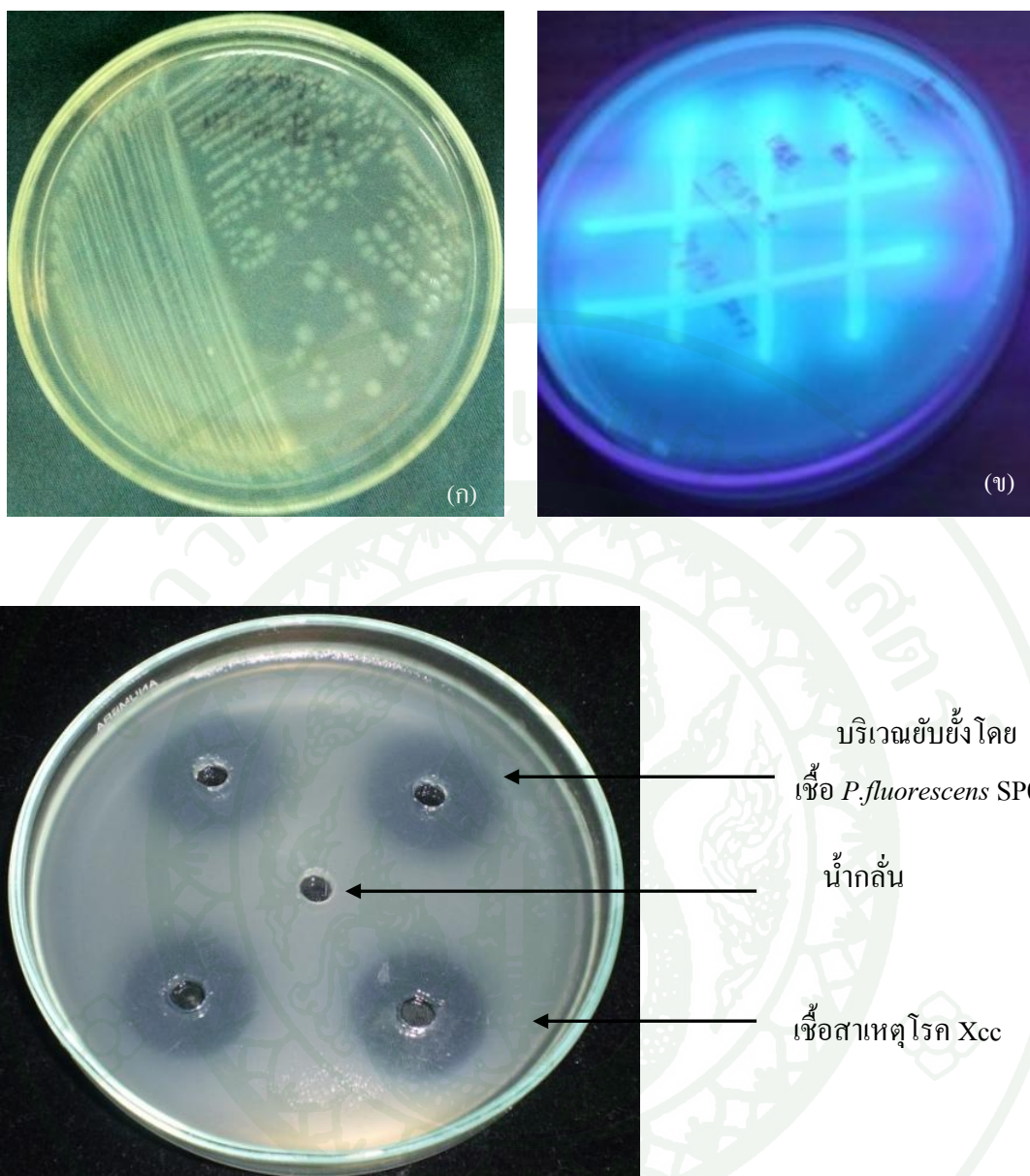
ผลคำนวณค่า growth parameter ตามวิธีการของ Delahaut, (1997) ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีการคลุกเมล็ดด้วย SP007s ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 cfu/ml และพ่นใบซ้ำเมื่อคะน้าอายุ 14 21 และ 28 วัน ที่ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml 10 มิลลิลิตร: คะน้า 1 ต้น ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตต้นคะน้าดีที่สุดทั้ง 3 อายุคือ ที่อายุ 14 35 และ 65 วัน ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต

ที่สุดเท่ากับ 27 38 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่พ่นใบอย่างเดียว 3 ครั้ง ให้ผลการเจริญเติบโตของคะน้าเท่ากับ 24 33 และ 38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นเท่ากับ 19 21 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำ จากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ SP007s ในลักษณะ cell suspension คลุกเมล็ด คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบด้วย SP007s และพ่นใบด้วย SP007s 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี copperhydroxide และน้ำกลั่นในการควบคุม ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ปลูกเชื้อ XCC และกลุ่มที่ไม่ปลูกเชื้อ ทำการประเมินผลโดยการวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีการของ วิลาวรรณ และคณะ (2549) ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่คลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นใบ 3 ครั้ง เมื่อคะน้าอายุ 14 21 และ 28 วันด้วย SP007s เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุดพบ พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ และมีระดับความรุนแรงโรคเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ใบทั้งหมด (ตารางที่ 5)

2.2 ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนใยผัก

การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมหนอนใยผัก จากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ SP007s ในลักษณะ cell suspension คลุกเมล็ดที่ความเข้มข้น 1×10^6 cfu/ml 10 มิลลิลิตร: ค่น้ำ 1 กิโลกรัม ร่วมกับการพ่นใบซ้ำที่ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml อัตรา 10 มิลลิลิตร: ค่น้ำ 1 ต้น เมื่อคะน้าอายุ 14 21 และ 28 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นและการใช้สาร cypermethrin ในการควบคุม โดยปล่อยหนอนบนใบพืชเมื่อคะน้าอายุ 30 วัน และประเมินผลโดยวัดอัตราการตาย การยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผักและการวางไข่ของหนอนใยในรุ่นถัดไป ผลการทดลองพบว่า ทั้งในห้องปฏิบัติการและทดลองให้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่า ค่น้ำที่ปลูกโดยใช้เชื้อ SP007s ควบคุมให้อัตราการตายของหนอน การยับยั้งการกินอาหารและการวางไข่ในรุ่นถัดไปได้ดีที่สุดเท่ากับ 69.0 89.5 และ 3.80 เปอร์เซ็นต์ (ห้องปฏิบัติการ) 65 75.5 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ (เรือนทดลอง) แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 7 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ลักษณะโคโลนีขาวครีม แบบ ขอบเรียบ เหลือบแสง ที่เจริญบนอาหาร NGA (ก) สามารถสร้างสารเรืองแสงได้บนอาหาร King medium B (ข) และสร้างสาร secondary meabolite ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ (ค)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นคะน้า และการควบคุมโรคเน่าดำ¹

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของคะน้า			โรคเน่าดำ	
	(%) ^{2/}			การเกิดโรค (%)	ระดับความรุนแรงโรค ^{3/}
	อายุพืช (วัน)				
	14	35	65		
1. น้ำกลั่น	19b	21c	23d	84 c	4
2.copper hydroxide	22ab	25bc	32bc	29 b	2
3. คลุกเมล็ดด้วย SP007s	27a	29b	35b	8 a	1
4. คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นใบด้วย SP007s	27a	38a	42a	3 a	1
5. พ่นใบด้วย SP007s	24ab	33ab	38ab	9 a	1
% (CV)	14.59	45.25	18.81	-	-

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

^{2/}สมการคำนวณค่าการเจริญเติบโต = (ความสูงลำต้น + น้ำหนักสด + ความยาวใบ + ความกว้างใบ)

4

^{3/}รายละเอียดตามวิธีการและอุปกรณ์และตารางภาคผนวกที่ 1 คือ ระดับ 0 = ใบพืชไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ ระดับ 1 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 1-25 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด ระดับ 2 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 26-50 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด ระดับ 3 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรงเท่ากับ 51-75 เปอร์เซ็นต์/พื้นที่ใบทั้งหมด ระดับ 4 = ลักษณะอาการโรคบนใบเหลือง/เป็นจุดรุนแรง 76-100 เปอร์เซ็นต์หรือใบแห้งร่วงหล่น

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการควบคุมหนอนใยผักด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ภายใต้อาหารปฏิบัติการณ์และสภาพเรือนทดลอง^{1/}

กรรมวิธี ^{2/}	ข้อมูลประเมิน (%) ^{3/}					
	ห้องปฏิบัติการ			เรือนทดลอง		
	Mortality	AFI	ER	Mortality	AFI	ER
1. น้ำกลั่น	0c	0c	0	0	0	75.68c
2. ใช้เชื้อ SP007s	69a	89.5a	3.8b	65b	75.50a	16.00a
3. ใช้ Cypermethrin	75b	70.5b	39.0a	70a	70.50a	35.65b
F-test	*	*	*	*	*	*
% (CV)	75.01	22.53	33.66	86.78	86.75	71.66

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range test วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

^{2/} ใช้กะน้ำใบที่ 2 นับจากยอดคะน้าของคะน้าอายุ 30 วัน ที่ผ่านการคลุกเมล็ดและพ่นใบตามแต่ละกรรมวิธีเมื่อ อายุคะน้า 14 21 และ 28 วัน

^{3/} Mortality, AFI (antifeeding inhibition) และ ER (Egg repellen) = เปอร์เซ็นต์อัตราการตาย , เปอร์เซ็นต์อัตราการยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผัก เปอร์เซ็นต์อัตราการวางไข่ของผีเสื้อหนอนใยผัก จำนวนหนอนใยผักที่พบหลังจากปล่อยผีเสื้อหนอนใยผักให้วางไข่และเจริญเป็นตัวหนอน ตามลำดับ

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s

3.1 การพัฒนาอาหารเพิ่มปริมาณ

อาหารเพิ่มปริมาณ *P. fluorescens* SP007s ซึ่งให้ผลการคัดเลือกชนิดน้ำสกัดพืชหรือ รัญพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s ที่คัดเลือก จากวัตถุดิบที่ให้สารคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และกระบวนการ เมตาบอลิซึมของเชื้อปฏิบัณช์เพื่อใช้เป็นสารผสมในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย ปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s ผลการทดลองคัดเลือกโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s เพิ่มจำนวนภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในน้ำสกัดพืช/ พืชที่คัดเลือกมา พบว่า ในน้ำสกัดมันฝรั่งเป็นแหล่งพลังงานที่ให้คาร์บอนได้ดีที่สุด โดยสามารถ เพิ่มจำนวนเซลล์ ได้เท่ากับ 3×10^{13} cfu/มิลลิลิตร และน้ำสกัดกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ดีที่สุด โดยเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 3×10^8 cfu/ มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดพืชและ รัญพืชทั่วไป แต่ยังคงมีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NGB และ KB (ตารางที่ 7) จึง จำเป็นต้องปรับส่วนผสมเพื่อพัฒนาน้ำสกัดมันฝรั่งและน้ำสกัดถั่วเหลืองเป็นตัวแทนในการนำมา ผลิตอาหารเพิ่มปริมาณ มาศึกษาหาสัดส่วนผสมที่เหมาะสมโดยทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหาร เหลวผสมและจากการดัดแปลงมีส่วนผสมและอัตราส่วนของ กากถั่วเหลืองต่อมันฝรั่ง 1:1 1:0.5 1:0.25 1:0 0:1 0.25:1 และ 0.5:1 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณเซลล์ด้วยวิธี 10 fold dilution พบว่าสูตรอาหารที่ได้จากการนำ กากถั่วเหลืองผสมด้วยมันฝรั่ง ที่อัตราส่วน 1 : 0.5 สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ ให้มีปริมาณมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 3×10^{22} cfu /มิลลิลิตร มีระยะเวลาการผลิตและเพิ่ม ปริมาณเซลล์มากที่สุด จึงให้ชื่ออาหารดังกล่าวว่า SPMP (Soybean Potato- Modified for *Pseudomonas fluorescens* SP007s medium) (ตารางที่ 8)

ผลการทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวมาศึกษาปัจจัยตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหาร SPMP medium ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s โดยทดสอบ ความเป็นกรด่างที่เหมาะสมในอาหาร SPMP ทดสอบที่ pH เท่ากับ 5 6 7 8 พบว่า ที่ความเป็นกรด ่างที่ 6-7 ที่เป็นกรด่างตั้งต้นในอาหารดังกล่าวได้ดีที่สุดแตกต่างทางสถิติ โดยมีจำนวนเซลล์ แบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 3×10^{24} cfu/มิลลิลิตรและ การ ทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens*

SP007s จากการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมพบว่าอุณหภูมิในช่วง 25- 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ *P. fluorescens* SP007s สามารถเพิ่มปริมาณ ได้มากที่สุดอยู่ในช่วง 3×10^{22} - 3×10^{24} cfu/มิลลิลิตร (ตารางที่ 9) และได้้นำผลที่ได้จากการทดสอบปัจจัยตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในอาหาร SPMP โดยจะประกอบด้วยน้ำดื่มสกัด อัตราส่วนกากถั่วเหลืองต่อมันฝรั่ง (1:0.5) ในน้ำ 1 ลิตร โดบปรับความเป็นกรด –ด่างที่ 7 และเลี้ยงเขย่าข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป NB และ KB medium และอาหารตัดแปลงของ ชัยสิทธิ์ (2549) ผลการทดลองพบว่าอาหาร SPMP medium เป็นอาหารที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏเทียบเท่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ NGB ที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏเท่ากับ 3×10^{24} cfu/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตในน้ำกลั่น (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ในอาหารเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์

น้ำสกัดพืชและธัญพืช	ปริมาณเชื้อ ^{1/} log (cfu/ml)
	เวลา 24 ชม.
1. มันฝรั่ง	3×10^{18} ab
2. ข้าวฟ่าง	3×10^2 d
3. ข้าวโพด	3×10^3 d
4. ข้าวบาร์เลย์	3×10^6 c
5. ข้าวเปลือก	3×10^4 d
6. ข้าวสาลี	3×10^8 c
7. ข้าวเปลือก	3×10^6 c
8. ถั่วเขียว	3×10^{12} bc
9. ถั่วเหลือง	3×10^{18} ab
10. ถั่วแดง	3×10^{12} b
11. ถั่วลิสง	3×10^{12} bc
12. MS medium (ซัยลิตี , 2549)	3×10^{14} b
13. Nutrient Glucose Both	3×10^{20} a
14. King medium B	3×10^{22} a
% (cv)	62.65

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

^{2/} การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^8 cfu/ml ที่เจริญในน้ำคั้นสกัดพืชและธัญพืช ตรวจนับจำนวนเมื่อบ่มเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 8 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ในอาหาร Soybean
Potato-Modified for *Pseudomonas* SP007s medium (SPMP)

อัตราส่วน ^{1/} ถั่วเหลือง:มันฝรั่ง ^{2/}	ปริมาณเชื้อ ^{1/} log (cfu)					
	เวลา (ชม.)					
	0	6	12	18	24	30
1:0.25	1x10 ⁶	3x10 ¹⁰ a	3x10 ⁸ a	3x10 ²⁰ a	3x10 ²² a	3x10 ²⁰ a
1:0.5	1x10 ⁶	3x10 ⁸ b	3x10 ¹² c	3x10 ¹⁴ c	3x10 ¹² d	3x10 ¹⁰ e
1:0	1x10 ⁶	3x10 ⁸ b	3x10 ¹⁰ d	3x10 ¹² d	3x10 ⁹ e	3x10 ⁶ f
0:1	1x10 ⁶	3x10 ⁷ bc	3x10 ⁹ de	3x10 ¹⁰ e	3x10 ⁸ e	3x10 ⁶ f
0.25:1	1x10 ⁶	3x10 ⁸ b	3x10 ¹² c	3x10 ¹⁴ c	3x10 ¹⁵ c	3x10 ¹² cd
0.5:1	1x10 ⁶	3x10 ⁹ ab	3x10 ¹⁴ b	3x10 ¹⁶ b	3x10 ¹⁸ b	3x10 ¹⁴ c
% (cv)	0	12.39	20.57	24.03	38.60	46.91

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

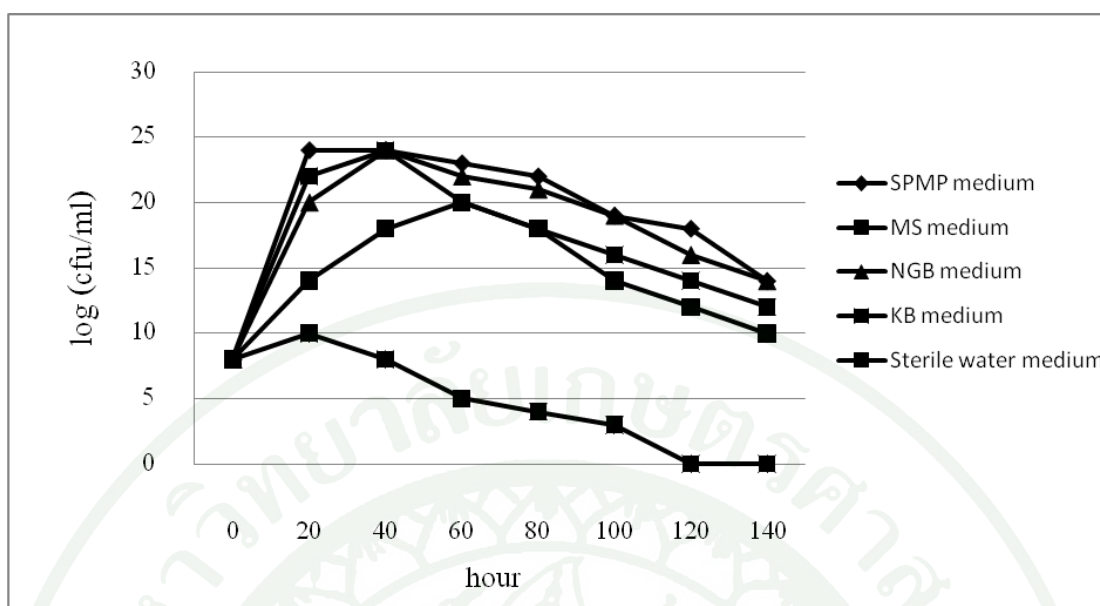
^{2/} อัตราส่วนของอาหาร SPMP ประกอบด้วยถั่วเหลืองต่อมันฝรั่ง (กรัม) ในน้ำ 1 ลิตร เพื่อสกัดเอาน้ำดื่มผสมมาเลี้ยงเชื้อ *P. fluorescens* SP007s

ตารางที่ 9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ในอาหาร SPMP

ปัจจัยควบคุม ^{2/}	ปริมาณเชื้อ ^{1/} log (cfu/ml)	
	เวลา (24 ชม.)	
กรด-ด่าง	5	3×10^{18} b
	6	3×10^{24} a
	7	3×10^{25} a
	8	3×10^{10} b
% (cv)		14.57
อุณหภูมิ	25	3×10^{24} a
	30	3×10^{22} a
	35	3×10^{20} b
	40	3×10^{12} c
% (cv)		22.44

^{1/}หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

^{2/}นำอาหาร SPMP มาปรับให้มีความเป็นกรด -ด่าง เริ่มต้น และควบคุมอุณหภูมิการเจริญ เชื้ออาหาร SPMP ที่ควบคุมปัจจัยดังกล่าวนาน 24 ชั่วโมงและตรวจสอบนับปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 8 จีฟจักรของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^8 cfu/ มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SPMP (อาหารดัดแปลงชนิดใหม่) เปรียบเทียบ MS (อาหารดัดแปลง) (ชัยสิทธิ์, 2549) NGB (อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป) KB (อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ *P. fluorescens*) และ sterile water (เลี้ยงในน้ำกลั่น)

3.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์

การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารพาของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s โดยการผสมจุลินทรีย์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 3×10^{18} cfu/ มิลลิลิตร) กับสารพาที่เตรียมไว้ 80 กรัม และตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดโดยเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (เก็บในพลาสติกที่ปิดสนิทด้วยการซิลปากถุง) ความสามารถในการละลายตัว (dissolve) ความสามารถในการแขวนลอยในน้ำ (suspension) และความสามารถในการพาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการจับใบ ผลการทดลองพบว่า สารพาที่มีส่วนผสมของ Kaolin : deshecofix : SiO_2 : CaSO_3 เป็นส่วนผสมของสารพาที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ผลการทดสอบในการเก็บรักษา (Viability) เก็บรักษานาน 6 เดือน ให้ค่าการละลายน้ำก่อนพ่นใบ (disolution) ให้ค่าการแขวนลอยของสารพา (suspension) และการจับใบของสารพา (Leaf soaking) เท่ากับ 3×10^{10} cfu/ มิลลิลิตร ระดับ 1 คือละลายน้ำได้ภายใน 1 นาที ตกตะกอนช้าสุด 12 ชั่วโมง และทำให้ปริมาณของเชื้อ *P. fluorescens* SP007s จับบนใบเท่ากับ 3×10^8 cfu/ มิลลิลิตร (ตารางที่ 9)

การทดสอบประสิทธิภาพสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ใช้สารพาที่ได้จากการคัดเลือกที่ดีที่สุด คือ Kaolin : Deshecofix : SiO_2 : CaSO_3 ผสมกับอัตราส่วนสารเสริมประสิทธิภาพ และประเมิน ผลด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตเมื่อค่น้ำอายุ 65 วัน ด้านการควบคุมโรค (การเกิดโรค/ความรุนแรงโรค) ด้านการควบคุมแมลง (การยับยั้งการกินอาหาร) และควมมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ผลการทดลองพบว่า Kaolin : Deshecofix : SiO_2 : CaCO_3 : lactose : CMC : FeSO_4 เป็นส่วนผสมที่ดีที่สุด ให้ผลการทดลองเท่ากับ 35 เปอร์เซนต์การส่งเสริมการเจริญเติบโต ค่น้ำเกิดโรคเน่าดำเพียง 1 เปอร์เซนต์ มีความรุนแรงโรคอยู่ในระดับ 1 ยับยั้งการกินค่น้ำของหนอนใยผัก 29 เปอร์เซนต์ และมีชีวิตรอด 3×10^{13} cfu/ มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาที่อายุผลิตภัณฑ์ 6 เดือนได้ดีที่สุด (ตารางที่10)

การทดสอบ อัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพผลการทดสอบประสิทธิภาพ พบว่า อัตราส่วนของ Kaolin : Deshecofix : SiO_2 : CaCO_3 : lactose : CMC : FeSO_4 ที่อัตราส่วน 70: 14 : 8 : 5 : 1 : 1 : 1 เป็นอัตราส่วนที่ให้ผลการประเมินผลในทุกด้านดีที่สุดเท่ากับ 3×10^{12} cfu/ มิลลิลิตร(viability ที่อายุ 12 เดือน) การละลายในระดับ 1 การแขวนลอยในน้ำระดับ 1 ส่งผลให้เชื้อ *P. fluorescens* SP007s จับใบ 3×10^8 cfu/ มิลลิลิตร ส่งเสริมค่น้ำเจริญเติบโต 34 เปอร์เซนต์ เกิดโรคทดสอบเพียง 1 เปอร์เซนต์ มีความรุนแรงโรคในระดับ 1 สามารถยับยั้งการกินค่น้ำของหนอนใยผักเท่ากับ 24 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 11) จึงให้ชื่อผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ชนิดใหม่นี้ว่า KUwin/Gap SP007s

การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *P. fluorescens* SP007s ชนิดใหม่ (KUwin/Gap SP007s) เปรียบเทียบกับชนิดเดิม (ISR- $\text{P}^{\text{®}}$) การทดลองประสิทธิภาพพบว่า ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ให้ประสิทธิภาพดีที่แตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$) คงควมมีชีวิตที่อายุผลิตภัณฑ์ 12 เดือนที่เก็บไว้อุณหภูมิห้องเท่ากับ 3×10^{12} cfu/ มิลลิลิตร ให้ค่าการละลายน้ำเท่ากับ 1 ค่าแขวนลอยระดับ 1 จับใบได้เท่ากับ 3×10^8 cfu/ มิลลิลิตร ส่งเสริมการเจริญเติบโตเท่ากับ 35 เปอร์เซนต์ เกิดโรค 3 เปอร์เซนต์ทดสอบ และมีความรุนแรงโรคอยู่ในระดับ 1 ยับยั้งการกินใบค่น้ำของหนอนใยผักเท่ากับ 26 เปอร์เซนต์ (ตารางที่12)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพสารพาแต่ละชนิดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s

สารพา	Viability ^{1/}	Dissolution ²	Suspension ^{3/}	Leaf soaking ^{4/}
1.Talcum	3X10 ¹³ a	5	3	3X10 ⁷ b
2.Kaolin	3x10 ¹³ a	2	2	1X10 ⁸ a
3.Powder potato	3X10 ¹³ a	4	2	3X10 ⁶ c
4.Lime	3X10 ¹² b	3	4	3X10 ⁵ d
5.Dolomite	3X10 ¹³ a	5	5	3X10 ⁶ c
6.Powder milk	3X10 ¹² b	2	2	3X10 ⁷ b
7.Talcum + Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹³ a	4	2	1X10 ⁸ a
8.Kaolin + Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹³ a	1	1	3X10 ⁸ a
9.Powder potato + Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹³ a	3	1	3X10 ⁷ b
10.Lime + Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹² b	2	3	3X10 ⁶ c
11.Dolomite + Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹³ a	4	4	3X10 ⁷ b
12.Powder milk+ Deshecofix + SiO ₂ + CaSO ₃	3X10 ¹¹ bc	1	1	1X10 ⁸ a
% (CV)	5.31	-	-	-

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) โดย ^{1/} Viability หมายถึง ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ที่อายุเก็บรักษาในช่องพลาสติกที่ปิดปากของนาน 6 เดือน ^{2/}Dissolution ^{3/}Suspension และ ^{4/}Leaf soaking รายละเอียดการทดสอบอยู่ในวิธีการข้อ 3.1

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

สารพา ^{1/} + สารเสริมประสิทธิภาพ	%	การควบคุมโรคเน่าดำ		AFI ^{2/}	Viability ^{3/}
	การ	%	ความ		
	เจริญเติบโต	การเกิดโรค	รุนแรงโรค		
	ค่น้ำอายุ 65 วัน				
1. สารพา : glucose	30b	4	1	25	2X10 ¹³ ab
2. สารพา : sucrose	29c	55	1	24	1X10 ¹³ b
3. สารพา : lactose	31b	3	1	28	3X10 ¹³ a
4. สารพา : dextrose	28c	7	1	24	2X10 ¹³ ab
5. สารพา : glucose : CMC : FeSO ₄	35a	1	1	27	3X10 ¹³ a
6. สารพา : sucrose : CMC : FeSO ₄	34a	2	1	28	3X10 ¹³ a
7. สารพา : lactose : CMC : FeSO ₄	35a	1	1	29	3X10 ¹³ a
8. สารพา : dextrose : CMC : FeSO ₄	35a	1	1	23	3X10 ¹³ a
% (CV)	9.10	-	-	8.72	30.23

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) สารพา^{1/} หมายถึง Kaolin + Deshefix + SiO₂ + CaSO₃ ^{2/}AFI หมายถึงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินค่น้ำ ^{3/} Viability หมายถึงความสามารถการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s ที่อายุการเก็บรักษาในซองพลาสติกที่ปิดปากซองพลาสติกที่เก็บรักษานาน 6 เดือนรายละเอียดกรรมวิธีทดสอบและการประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3.1 และ 3.2

ตารางที่ 12 อัตราส่วนระหว่างสารอาหารและสารพา (Kaolin : deshecofix : SiO₂ : CaCO₃ : lactose : FeSO₄)

อัตราส่วน	Viability ^{1/}	Dissolve ^{2/}	Suspension ^{3/}	Leaf soaking ^{4/}	%	การควบคุมโรคเน่าดำ		AFI ^{5/}
						การเกิดโรค	ระดับความรุนแรงโรค	
65:15:1:7:10:1:1	3X10 ¹¹ b	3	3	3X10 ⁶ c	28b	9	1	17 b
74:8:1:5:14:1:1	3X10 ¹² a	1	1	3X10 ⁸ a	34a	1	1	24 a
80:5:1:5:10:1:1	3X10 ¹⁰ c	2	2	3X10 ⁷ b	31a	1	11	22 a
90:18:1:6:16:1:1	2X10 ¹⁰ c	4	4	3X10 ⁸ a	27b	8	1	16 b
100:20:1:5:15:1:1	1X10 ¹⁰ c	5	5	3X10 ⁸ a	26b	11	1	15 b
% (CV)	8.437	-	-	12.08	11.20	-	-	20.06

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) โดย ns หมายถึง ไม่แตกต่างทางสถิติ และ * หมายถึง แตกต่างทางสถิติ ^{1/} Viability หมายถึง ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่อายุการเก็บรักษาในช่องพลาสติกที่ปิดปากของพลาสติกที่เก็บรักษานาน 6 เดือน ^{2/} Dissolve ^{3/} Suspension และ ^{4/} Leaf soaking ^{5/} AFI หมายถึงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินค่น้ำ ³ รายละเอียดกรรมวิธีทดสอบและการประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ระหว่างชนิดใหม่คือ KUwin/Gap SP007s และ ISR-P® (ชนิดเก่า)

ผลิตภัณฑ์	Viability ^{1/}	Dissolve ^{2/}	Suspension ^{3/}	Leaf soaking ^{4/}	% การ เจริญเติบโต	การควบคุมโรคเน่าดำ		ควบคุม แมลง
						การเกิดโรค	ความรุนแรง โรค	% AFI ^{5/}
1. KUwin/Gap SP007s	3x10 ¹²	1	1	3x10 ⁸	35	3	1	26a
2. ISR P®	3x10 ¹²	4	5	3x10 ⁷	30	11	1	20b
% (CV)	-	-	-	7.28	9.87	-	-	14.52

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05)

^{1/} Viability หมายถึง ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ที่อายุการเก็บรักษาในช่องพลาสติกที่ปิดปากของพลาสติกที่เก็บรักษานาน 6 เดือน ^{2/} Dissolve ^{3/} Suspension และ ^{4/} Leaf soaking ^{5/} AFI หมายถึงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินค่น้ำ ร่ายละเอียดกรรมวิธีทดสอบและการประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3

4. การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์

4.1 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพ KUwin/Gap SP007s ในเรือนทดลอง โดยมีกรรมวิธีการคือ คลุกเมล็ดค่อน้ำก่อนปลูก 1 กรัมต่อเมล็ดค่อน้ำ 1 กิโลกรัมและพ่นใบตาม 3 ครั้ง อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร ที่ค่อน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ ISR-P® กรรมวิธีที่ใช้สาร Copper hydroxid และ Cypermethrin และกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่น ประเมินผลการเจริญเติบโตการเกิดโรคเน่าดำ โดยการปลูกเชื้อโรคเน่าดำ การยับยั้งการกินค่อน้ำของหนอนใยผัก การวางไข่และอัตราการตาย พบว่าผลิตภัณฑ์ชนิดที่มีประสิทธิภาพที่สุด ($P=0.05$) เท่ากับ 35 11 27 16 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ ISR เท่ากับ 29 21 24 27 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับควบคุมโรคด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 14)

4.2 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพไร่

การทดสอบประสิทธิภาพ KUwin/Gap SP007s ในเรือนทดลอง โดยมีกรรมวิธีการคือ คลุกเมล็ดค่อน้ำก่อนปลูก 1 กรัมต่อเมล็ดค่อน้ำ 1 กิโลกรัมและพ่นใบตาม 3 ครั้ง อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร ที่ค่อน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ ISR-P® กรรมวิธีที่ใช้สาร Copper hydroxid และ Cypermethrin กรรมวิธีการดั้งเดิมการใช้น้ำหมักพ่นสลับกับสารควบคุมโรค Cabendazim และกรรมวิธี ใช้น้ำในการควบคุม ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s มีประสิทธิภาพดีที่สุด ($P=0.05$) แตกต่างทางสถิติ โดยส่งเสริมการเจริญเติบโต เท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิต 11.95 ตันต่อไร่ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าดำ (*X. campestris* pv. *campestris*) ใบจุด Alternaria (*Alternaria brassicicola*) ราเน่าค้ำ (*Peronospora parasitica*) และเน่าและ (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) เท่ากับ 4 4 7 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การเจอแมลงศัตรู คือ หนอนใยผัก ค้างหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก เท่ากับ 4 4 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และตารางที่ 16)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี	%	การควบคุมโรค		การควบคุมแมลง (%)		
		(%)	ระดับความรุนแรง	AFI ^{2/}	ER ^{3/}	Mortality ^{4/}
1.KUwinGap SP007s	35 a	11 a	1	27a	16a	60a
2.ISR-P [®]	29 b	21 b	2	24ab	27b	45b
3. Copper hydroxid /Cypermethrin	18 d	24 c	3	20b	56c	55a
4. Sterile water	21 c	65 d	4	0c	80d	0c
% (CV)	29.98	78.76	51.64	68.60	64.65	68.47

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรในแนวตั้งเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) ^{1/} ประสิทธิภาพของการส่งเสริมการเจริญเติบโต การควบคุมโรคเน่าดำ และการควบคุมหนอนไขผักโดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูก ฟันตาม 3 ครั้ง ที่อายุค่น้ำ 14, 21 และ 28 วัน และปลูกเชื้อสาเหตุโรคตาม เมื่อค่น้ำอายุ 29 วัน ^{2/} AFI ^{3/} ER และ ^{4/} Motality รายละเอียดกรรมวิธีการทดสอบ และประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทดสอบในสภาพไร่

กรรมวิธี	คุณภาพผลผลิต		การเกิดโรค (%)				ความรุนแรงโรค น้ำดำ
	(%) การ เจริญเติบโต	ผลผลิต (ตัน/ไร่)	น้ำดำ	ใบจุด Alternaria	ราน้ำค้าง	น้ำละ	
1. KUwin/Gap SP007s	42 a	11.95 a	4a	4a	7a	0a	1
2. ISR-P [®]	37 b	9.9 b	11a	6a	8a	3a	2
3. Copper hydroxide/ Cypermethrin	28 bc	5.2 c	23b	12b	16b	13b	3
4. กรรมวิธีดั้งเดิม (conventional)	34 b	7.89 bc	35c	14b	12b	18b	3
5.กรรมวิธีควบคุม (control)	23 c	4.9 c	80d	15b	17b	18b	4
% (CV)	22.75	37.99	98.22	48.22	37.73	81.19	43.85

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) ประสิทธิภาพการควบคุมโรคและแมลงโดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s (KUwin/Gap SP007s) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ ISR-P[®] ผลิตภัณฑ์ Copper hydroxid และ Cypermethrin กรรมวิธีการดั้งเดิมการใช้น้ำหมักพ่นสลับกับสารเคมี และกรรมวิธี ใช้น้ำในการควบคุม รายละเอียดการทดสอบและการประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงศัตรูกระแต้ทดสอบในสภาพไร่

กรรมวิธีการ	(%) จำนวนแมลงศัตรูกระแต้		
	หนอ นโยผัก	คั้ง หมัดผัก	หนอน กึบ
1. KUwin/Gap SP007s	44a	45b	55b
2. ISR-P [®]	55b	55c	65c
3. Copper hydroxide/ Cypermethrin	35a	15a	11a
4. กรรมวิธีดั้งเดิม	65c	60d	65c
5. กรรมวิธีควบคุม	80d	90e	70d
% (CV)	72.59	59.02	52.2

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) ประสิทธิภาพการควบคุมโรคและแมลงโดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ *P. fluorescens* SP007s (KUwin/Gap SP007s) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ ISR-P[®] ผลิตภัณฑ์ Copper hydroxide และ Cypermethrin กรรมวิธีการดั้งเดิมการใช้น้ำหมักพ่นสลับกับสารเคมี และกรรมวิธี ใช้น้ำในการควบคุม รายละเอียดการทดสอบและการประเมินผลอยู่ในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2

5. การศึกษากลไกชักนำภูมิต้านทาน

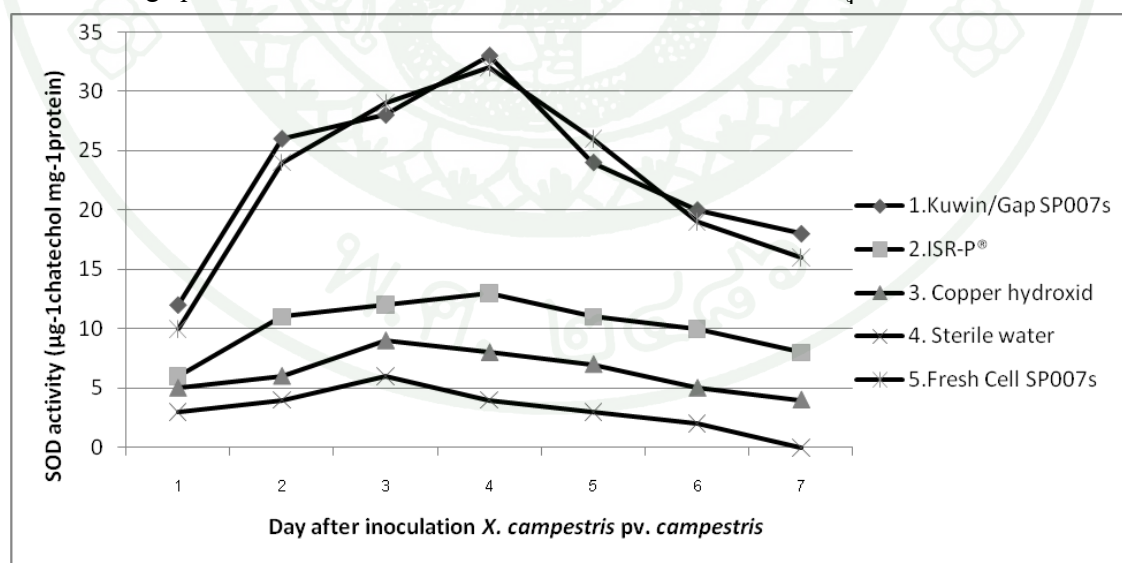
5.1 กลไกชักนำภูมิต้านทานทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบการชักนำให้กะน้ำตาลกลไกในการปกป้องตัวเอง สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคและแมลงโดยใช้เชื้อ *P. fluorescens* SP007s ในรูปผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางกระบวนการชีวเคมีที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ Superoxide dismutase (SOD) และการสะสมของ glucosinolate ในกะน้ำตาลเปรียบเทียบกับ *P. fluorescens* SP007s ในรูปผลิตภัณฑ์ ISR-P® การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคเน่าดำ Copper hydroxide และการใช้สารเคมีควบคุมหนอนใยผัก Cypermethrin การใช้น้ำกลั่นในการควบคุม และการใช้เซลล์สด SP007s ซึ่งจะนำเมล็ดคลุกด้วยผลิตภัณฑ์ดังกล่าว (1 กรัมต่อเมล็ดกะน้ำตาล 1 กิโลกรัม) และพ่นใบ (10 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร) 3 ครั้งที่อายุ 14 21 และ 28 วัน ในสภาพเรือนทดลองซึ่งจะตรวจสอบสาร SOD และ glucosinolate โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบการทดลองคือ 1. หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยเมื่อกะน้ำตาลอายุ 30 วันทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำลงบนใบกะน้ำตาลและเก็บใบกะน้ำตาลมาตรวจสอบโดยจะทำการเก็บใบกะน้ำตาลทั้งหมด 7 ครั้งทุก 24 ชั่วโมง 2. หลังปล่อยหนอนใยผักเข้าทำลายเมื่อกะน้ำตาลอายุ 30 วันโดยปล่อยหนอนนาน 24 ชั่วโมงและเก็บหนอนออกจากใบกะน้ำตาล เก็บกะน้ำตาลต้นที่ถูกหนอนกินมาทดสอบ โดยจะทำการเก็บใบกะน้ำตาลทั้งหมด 7 ครั้งทุก 24 ชั่วโมง 3. วัดการสะสมของสารดังกล่าวหลังจากการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ทุก 7 วันของอายุกะน้ำตาล

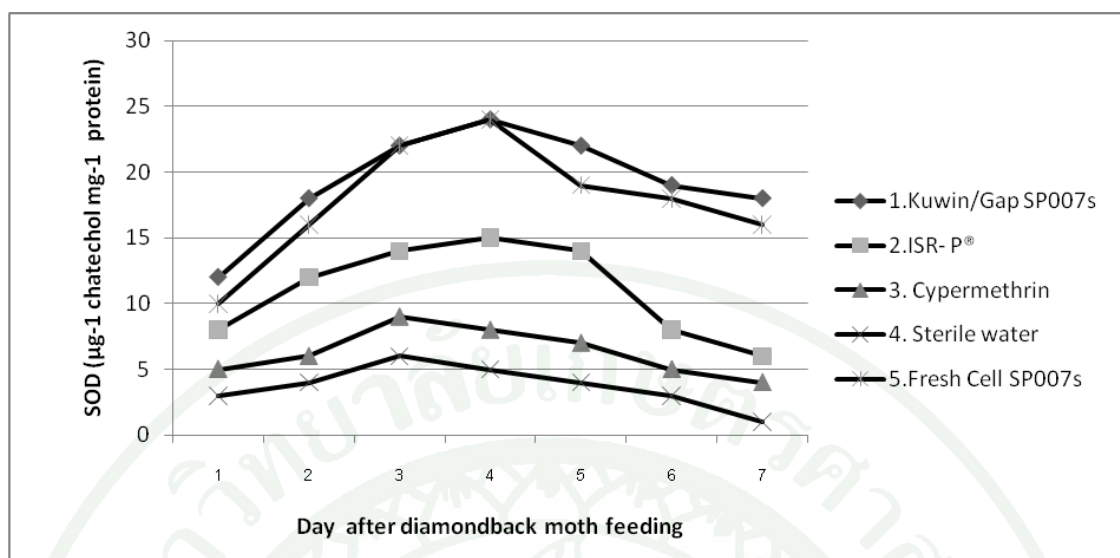
5.1.1 การศึกษาแนวโน้มการกระตุ้นภูมิต้านทานด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)

ผลการตรวจวัดของเอนไซม์ SOD หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ให้ผลดีที่สุด สามารถเหนี่ยวนำ/ชักนำให้กะน้ำตาลผลิต SOD เพิ่มขึ้นสูงสุดในทุกวันหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำโดยเหนี่ยวนำให้มีปริมาณ SOD สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ $33 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} protein รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s โดยมีค่า SOD เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ $32 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} protein เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ ISR-P® เท่ากับ $13 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} ($P=0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ Copper hydroxide และการใช้น้ำกลั่นในวันที่ 4 เท่ากับ $8 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} protein และ $6 \mu\text{g}^{-1}$ catechol mg^{-1} protein ตามลำดับ (ภาพที่ 9) โดยพบว่าผลการตรวจวัดเอนไซม์ SOD หลังจากปล่อยหนอนใยผัก

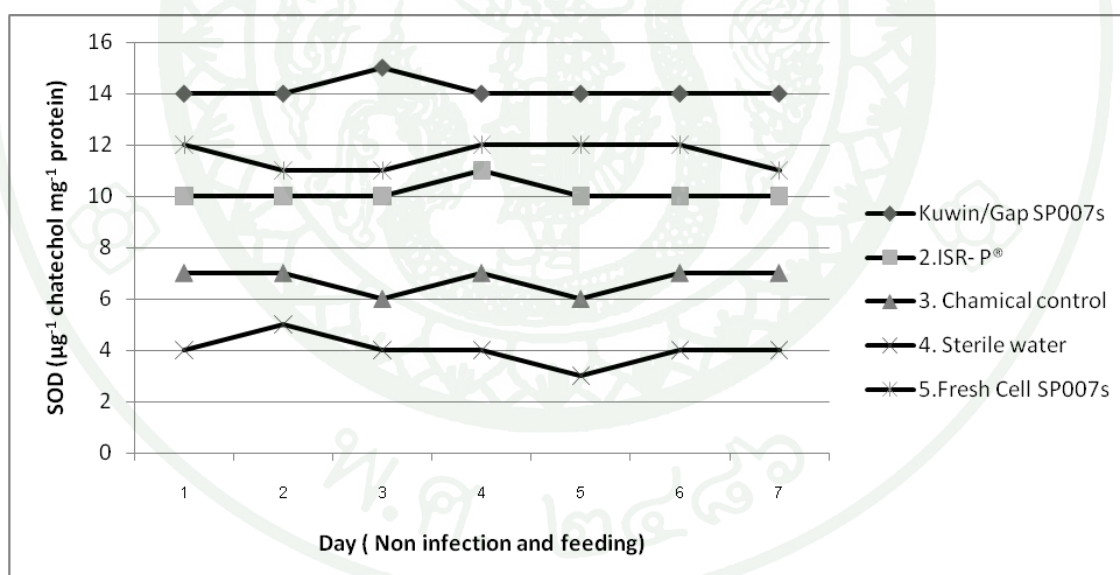
ให้ผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองกลไกชักนำให้กะน้ำตาลผลิต SOD หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำเช่นกัน คือกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s สามารถเหนี่ยวนำให้กะน้ำตาลสร้าง SOD ด้านทานหนอนใยผักได้สูงสุดในวันที่ 4 หลังจากปล่อยหนอน $24 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s ในการควบคุม สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ $24 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein และผลิตภัณฑ์ ISR-P[®] มี SOD สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ $15 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ Cypermethrin และกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่น เท่ากับ 8 และ $5 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein ตามลำดับ ($P=0.05$) (ภาพที่ 10) และนำผลการตรวจสอบ SOD ในการควบคุมโรคและหนอนใยผักมาเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคและปล่อยหนอนใยผักในวันและเวลาเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ SOD ที่เปลี่ยนแปลงพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ KUwin/Gap SP007s ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ SOD ให้ค่าเท่ากับ $14 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s เท่ากับ $11 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein และ ISR-P[®] เท่ากับ $10 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ Copper hydroxid /Cypermethrin และน้ำกลั่น เท่ากับ 7 และ $4 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein ตามลำดับ (ภาพที่ 11) และพบว่าผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ SOD ในทุก 7 วันของกะน้ำตาลในชุดไม่ปล่อยเชื้อสาเหตุโรคและหนอนใยผักให้ผลสอดคล้องกันคือกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s มีการสะสม SOD ดีที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$) เท่ากับ 14 14 16 18 14 15 14 และ $14 \mu\text{g}^{-1}$ chatechol mg^{-1} protein เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นในการควบคุม (ตารางที่ 17)



ภาพที่ 9 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในกะน้ำตาลหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง



ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังปล่อยหนอนใยผักทดสอบในสภาพเรือนทดลอง



ภาพที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ในชุดที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคและไม่ถูกหนอนเข้าทำลายทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

ตารางที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase ทุก 7 วันในกะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	superoxide dismutase (μg^{-1} catechol mg^{-1} protein)							
	อายุกะน้ำ (วัน)							
	7	14	21	28	35	42	56	65
1. KUwin/Gap SP007s	14a	14a	16a	18a	14a	15ab	14b	14b
2.ISR-P [®]	12ab	12ab	11b	13b	14a	18a	16a	18a
3.Copper hydroxide/ Cypermethrin	8b	7b	9c	10c	8b	6c	7c	10c
4.Sterile water	5c	6b	4d	5d	3c	4cd	4d	3d
5. Fresh cell SP007s	13	12	11	12	13	15	14	13
% (CV)	41.34	39.61	49.67	47.36	54.51	63.26	55.40	56.86

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรในแนวตั้งเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) ในกะน้ำที่ผ่านการคลุกเมล็ดกะน้ำ (1กรัม : เมล็ดกะน้ำ 1 กิโลกรัม) และพ่นใบตาม 3ครั้งที่อายุ 14 21และ 28 วันด้วยKUwin/Gap SP007s, ISR-P[®], Copper hydroxide/ Cypermethrin และน้ำกลั่น โดยตรวจสอบปริมาณ SOD ดังรายละเอียดตามอุปกรณ์และวิธีการข้อ 5

5.1.2 การศึกษาแนวโน้มการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานด้วยการวิเคราะห์ glucosinolate

ผลการตรวจวัดกิจกรรม glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ให้ผลดีที่สุด สามารถชักนำให้กะเน่าผลิต glucosinolate ในรูป glucoiberin และ sinigrin เพิ่มสูงสุดในทุกวันเมื่อเปรียบเทียบ กรรมวิธีอื่น โดยเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 หลังปลูกเชื้อเท่ากับ $18.66 \mu\text{mol/g}$ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s เพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 หลังปลูกเชื้อสาเหตุเท่ากับ $22.16 \mu\text{mol/g}$ กรรมวิธีที่ใช้ ISR- P[®] โดยมีค่า glucosinolate เพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 หลังปลูกเชื้อสาเหตุเท่ากับ $16.39 \mu\text{mol/g}$ เมื่อเปรียบเทียบในวันเดียวกับกรรมวิธีที่ใช้ Copper hydroxide และน้ำกลั่นเท่ากับ 6.99 และ $5.30 \mu\text{mol/g}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 18) โดยพบว่าปริมาณ glucosinolate ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากถูกหนอนใยผักเข้าทำลายพบว่าให้ผลสอดคล้องกับปริมาณ glucosinolate หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ โดยกรรมวิธีที่ใช้ KUwin/Gap SP007s กรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s การใช้เซลล์สด SP007s และกรรมวิธีที่ใช้ ISR- P[®] เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด สามารถชักนำให้ glucosinolate เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 หลังปล่อยหนอนใยผักเท่ากับ 16.66 15.88 และ $16.39 \mu\text{mol/g}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สาร Cypermethrin และน้ำกลั่น เท่ากับ 6.99 และ $5.30 \mu\text{mol/g}$ (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของ glucosinolate ในชุดการทดสอบที่ไม่มีการปล่อยหนอนใยผักและปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ KUwin/Gap SP007s มีการสะสม glucosinolate ในระดับที่สูงในทุกวัน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $12.00 \mu\text{mol/g}$ รองลงมากรรมวิธีที่ใช้เซลล์สด SP007s เท่ากับ $11.23 \mu\text{mol/g}$ และกรรมวิธีที่ใช้ ISR- P[®] เท่ากับ $10.00 \mu\text{mol/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ Cypermethrin และกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นเท่ากับ 7.00 และ $4.00 \mu\text{mol/g}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 20) และพบว่าผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ glucosinolate ในช่วง อายุ 7 14 21 28 35 42 49 56 และ 65 พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s มีการสะสม glucosinolate ในระดับดีที่สุด แตกต่างทางสถิติ ($P=0.05$) เท่ากับ 11.89 11.36 11.95 18.66 12.00 11.89 11.65 12.00 และ $12.11 \mu\text{mol/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นในการควบคุม (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 18 กิจกรรมสาร glucosinolate หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	glucosinolate ($\mu\text{mol/g}$)					
	เวลาหลังการการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ (วัน)					
	1	2	3	4	5	6
1. KUwin/Gap SP007s	12.89 a	14.65 a	16.89 a	18.66 ab	17.11 a	15.11 a
2. ISR -P [®]	10.13 ab	12.13 ab	14.43 ab	16.39 ab	14.65 ab	12.65 ab
3. Copper hydroxide	4.50 c	8.75 c	7.97 c	6.99 c	5.33 c	4.33 c
4. Sterile water	5.65c	6.67 c	6.00 c	5.30 c	3.99 c	3.00 c
5. Fresh cell SP007s	13.21a	14.85a	14.50ab	22.16a	18.5a	14.2a
% (CV)	47.15	33.55	45.67	56.36	64.05	68.47

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) ใบค่น้ำที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยผ่านการคลุกเมล็ดค่น้ำ (1กรัม: เมล็ด 1กิโลกรัม)ก่อนปลูกและพ่นใบ (10กรัม:น้ำ 1ลิตร) 3 ครั้ง เมื่อค่น้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ด้วยผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s, ISR-P[®], Copper hydroxide, Fresh cell SP007sและ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อตรวจสอบปริมาณ glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 19 กิจกรรมสาร glucosinolate หลังปล่อยหนอนใยผักในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	glucosinolate ($\mu\text{mol/g}$)					
	เวลาหลังการปล่อยหนอนใยผัก (วัน)					
	1	2	3	4	5	6
1. KUwin/Gap SP007s	11.59 a	12.65 a	13.89 a	16.66 a	14.11 a	13.11 a
2. ISR -P [®]	10.13 ab	11.13 ab	14.43 ab	16.39 ab	13.65 ab	12.65 ab
3. Cypermethrin	4.50 c	8.75 c	7.97 c	6.99 c	5.33 c	4.33 c
4. Sterile water	5.65c	6.67 c	6.00 c	5.30 c	3.99 c	3.00 c
5. Fresh cell SP007s	9.34b	11.1ab3	12.45a	15.88a	13.12ab	12.11ab
% (CV)	42.98	26.8	39.96	53.22	57.76	64.68

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ใบคะน้ำที่ถูกหนอนใยผักทำลายใบคะน้ำที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยผ่านการคลุกเมล็ดคะน้ำ (1กรัม: เมล็ด 1กิโลกรัม)ก่อนปลูกและพ่นใบ(10กรัม:น้ำ 1ลิตร) 3 ครั้ง เมื่อคะน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ด้วยผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s, ISR-P[®], Cypermethrin, , Fresh cell SP007s และ น้ำกลั่นนำมาเชื้อตรวจสอบปริมาณ glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 20 กิจกรรมสาร glucosinolate ชุดควบคุม ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	glucosinolate ($\mu\text{mol/g}$)					
	เวลา (วัน)					
	1	2	3	4	5	6
1. KUwin/Gap SP007s	11.36a	11.95a	18.66a	12.00a	11.86a	11.65a
2. ISR-P [®]	10.00b	9.35b	16.39b	9.63	9.71b	9.99b
3. Chemical control	7.79c	7.50c	6.99c	7.63c	7.77c	7.00c
4. Sterile water	4.59d	5.00d	5.30c	4.00d	4.23d	4.11d
5. Fresh cell SP007s	11.12a	10.11ab	15.66ab	11.23ab	11.11a	11.90a
% (CV)	35.48	34.48	56.36	40.72	38.59	40.67

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ใบคะน้ำที่ถูกหนอนใยผักทำลายใบคะน้ำที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยผ่านการคลุกเมล็ดคะน้ำ (1กรัม: เมล็ด 1กิโลกรัม)ก่อนปลูกและพ่นใบ (10 กรัม:น้ำ 1ลิตร) 3 ครั้ง เมื่อคะน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ด้วยผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s, ISR- P[®], Copper hydroxide/ Cypermethrin ,Fresh cell SP007s และ น้ำกลั่นนำมาเพื่อตรวจสอบปริมาณ glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 21 กิจกรรมสาร glucosinolate ทุก 7 วันในคะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

ผลิตภัณฑ์ควบคุม	glucosinolate ($\mu\text{mol/g}$)								
	อายุคะน้ำ (วัน)								
	7	14	21	28	35	42	49	56	65
1. KUwin/Gap SP007s	11.89 a	11.36 a	11.95 a	18.66 a	12.00 a	11.86 a	11.65a	12.00 a	12.11a
2. ISR-P [®]	9.97 b	10.00 b	9.35 b	16.39 b	9.63 b	9.71 b	9.99b	11.00 b	9.63b
3. Chemical control	8.71 c	7.79 c	7.50 c	6.99 c	7.63 c	7.77 c	7.00c	7.11 c	7.00c
4. ใช้น้ำกลั่นในการควบคุม	4.30 d	4.59 d	5.00 d	5.30 c	4.00 d	4.23 d	4.11d	4.69.d	4.71d
5. Fresh cell SP007s	11.67a	10.67b	11.9a8	16.88b	10.12b	11.32a	10.65ab	11.90b	11.18ab
% (CV)	36.96	35.38	34.48	56.36	40.72	38.59	40.67	25.73	38.34

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์ใบคะน้ำที่ปลูกหอนใยผักทำลายใบคะน้ำที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยผ่านการคลุกเมล็ดคะน้ำ (1กรัม: เมล็ด 1กิโลกรัม)ก่อนปลูกและพ่นใบ(10กรัม:น้ำ 1ลิตร) 3 ครั้ง เมื่อคะน้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ด้วยผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s, ISR- P[®], Copper hydroxide/ Cypermethrin และ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อตรวจสอบปริมาณ glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC

5.2 การทดสอบในสภาพไร่

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ในสภาพไร่ เปรียบเทียบกับการใช้ผลิตภัณฑ์ ISR-P® การใช้สารเคมีในการควบคุมโรค copper hydroxide/ Cypermethrin กรรมวิธีดั้งเดิม conventional (การใช้น้ำหมักสลับกับ cabendazim และกรรมวิธีการใช้น้ำเปรียบเทียบโดยกรรมวิธีจะคลุกเมล็ดค่น้ำและพ่นใบค่น้ำซ้ำเมื่อค่น้ำอายุ 14 21 และ 28 วัน ทำการประเมินสาร กระตุ้นการชักนำภูมิต้านทาน SOD และ glucosinolate โดยเก็บใบค่น้ำมาตรวจสอบทุก 7 วัน คือ เก็บใบค่น้ำทดสอบที่ช่วงอายุ 7 14 21 28 35 42 49 56 และ 65 วัน

5.2.1 การศึกษาแนวโน้มการกระตุ้นภูมิต้านทานด้วยการวิเคราะห์กิจกรรม superoxide dismutase (SOD)

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพสารชักนำภูมิต้านทาน SOD โดยเก็บใบค่น้ำจากสภาพไร่มาวัดปริมาณในห้องปฏิบัติการ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ KUwin/Gap SP007s มีการสะสม SOD มากที่สุดในทุกสัปดาห์ ของใบค่น้ำที่นำมาทดสอบ เท่ากับ 15 20 28 32 24 18 16 16 และ 15 μg^{-1} chatechol mg^{-1} protein รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ ISR -P® เท่ากับ 12 18 24 26 20 14 12 12 และ 11 μg^{-1} chatechol mg^{-1} protein เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ควบคุมด้วยน้ำเปล่า เท่ากับ 8 9 5 4 3 2 1 0 และ 0 μg^{-1} chatechol mg^{-1} protein ($P=0.05$) (ตารางที่ 22)

5.2.2 การศึกษาแนวโน้มการกระตุ้นภูมิต้านทานด้วยการวิเคราะห์ glucosinolate

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพสาร glucosinolate ที่มีในค่น้ำด้วยเครื่อง HPLC โดยเก็บทุกสัปดาห์มาตรวจสอบพบว่า กรรมวิธีที่ใช้ KUwin/Gap SP007s มีการสะสม glucosinolate มากที่สุดในทุกสัปดาห์ เท่ากับ 16.56 18.66 16.65 19.54 22.68 18.95 18.00 และ 18.15 $\mu\text{mol/g}$ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ ISR -P® เท่ากับ 13.93 12.79 14.25 12.63 17.89 16.65 16.79 15.95 และ 15.01 $\mu\text{mol/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ควบคุมด้วยน้ำเปล่า เท่ากับ 7.67 6.67 7.75 5.83 6.00 4.61 3.57 3.67 และ 3.21 $\mu\text{mol/g}$ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทุก 7 วัน ในค่น้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพไร่

กรรมวิธี ^{1/}	superoxide dismutase (μg^{-1} catechol mg^{-1} protein)								
	อายุค่น้ำ (วัน)								
	7	14	21	28	35	42	49	56	63
1.KUwin/Gap SP007s	15a	20a	28a	32a	24a	18a	16a	16a	15a
2. ISR P [®]	12b	18b	24ab	26b	20b	14b	12b	12b	11b
3. Chemical control	5d	6e	14c	10d	8d	6d	5d	4d	3d
4. Conventional	10c	12c	16b	14c	12c	10c	8c	7e	7c
5. water	8e	9d	5d	4c	3e	2e	1e	0e	0e
% (CV)	38.08	45.51	51.66	67.10	64.11	63.25	69.72	81.29	83.56

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรในแนวตั้งเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) โดยทุกกรรมวิธีผ่านการคลุกเมล็ด (1กรัม : เมล็ดค่น้ำ 1 กิโลกรัม) และพ่นใบตาม 3ครั้งที่อายุ 14 21และ 28 วันด้วยกรรมวิธีKUwin/Gap SP007s, ISR-P[®], Chemical control = Copper hydroxide/Cypermethrin Conventional control = น้ำหมักสับการใช้ cabendazim และน้ำในการควบคุม และตรวจสอบ superoxide dismutase ตามรายละเอียดและวิธีการในข้อ 5

ตารางที่ 23 กิจกรรมของสาร glucosinolate ทุก 7 วัน ในกะน้ำที่ปลูกทดสอบในสภาพไร่

กรรมวิธี ^{1/}	Glucosinolate ($\mu\text{mol/g}$)								
	อายุกะน้ำ (วัน)								
	7	14	21	28	35	42	49	56	63
1.KUwin/Gap SP007s	16.56a	18.66a	16.65a	19.54a	22.68a	18.95a	18.95a	18.00a	18.15b
2. ISR-P [®]	13.93ab	12.79b	14.52b	12.66b	17.89b	16.65b	16.79a	15.95b	15.01b
3. Chemical control	8.64c	7.69cd	10.69c	7.81c	9.55c	8.76d	7.70c	15.01b	7.00d
4. Conventional	11.04ab	9.49c	12.52c	10.78b	11.69c	13.62c	12.31b	12.00c	11.69c
5. Nontreated	7.67c	6.67d	7.75d	5.83c	6.00c	4.61e	3.57d	3.67d	3.21d
% (CV)	31.92	43.79	27.61	46.75	49.27	46.63	53.44	43.37	54.55

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรในแนวดิ่งเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ Duncan's New Multiple Range test (DMRT) วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ R 2.8.0 (P=0.05) โดยทุกกรรมวิธีผ่านการคลุกเมล็ด (1กรัม : เมล็ดกะน้ำ 1 กิโลกรัม) และพ่นไปตาม 3ครั้งที่อายุ 14 21และ 28 วันด้วยกรรมวิธีKUwin/Gap SP007s, ISR- P[®], Chemical control =Copper hydroxide/ Cypermethrin น้ำหมักสลับการใช้ cabendazin และน้ำในการควบคุมและตรวจสอบ glucosinolate ตามรายละเอียดและวิธีการในข้อ 5

วิจารณ์

โรคเน่าดำหรือที่ชาวบ้านเรียกว่าโรคขอบใบทองของคะน้า งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างโรคดังกล่าวในแหล่งปลูกผักคะน้า คือ จ. ปทุมธานี จ. สุพรรณบุรี จ.นนทบุรี และ จ. อ่างทอง โดยเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการขอบใบเริ่มเหลืองลุกลามเข้าเส้นกลางใบเป็นรูปตัววี และเส้นใบมีลักษณะเป็นสีดำซึ่งให้ลักษณะตรงตาม compendium of brassica (Rimmer *et al.*, 2006) โดยเชื้อสามารถเข้าไปในเส้นใบทำให้ท่อลำเลียงอาหารของคะน้าอุดตันทำให้เส้นใบบริเวณนั้นมีลักษณะเป็นสีดำ (Kamoun *et al.*, 1992) ซึ่งเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 191 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำได้เท่ากับ 125 สายพันธุ์ พบที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำคิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าดำในแต่ละพื้นที่คือ ได้จาก จังหวัด ปทุมธานี 35 เปอร์เซ็นต์ จังหวัด สุพรรณบุรี 42 เปอร์เซ็นต์ จังหวัด นนทบุรี 11 เปอร์เซ็นต์ และ จังหวัด อ่างทอง 12 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสอดคล้องกับข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจเกษตรที่รายงานไว้ว่า จังหวัด ปทุมธานี และจังหวัด สุพรรณบุรีเป็น แหล่งปลูกผักคะน้าที่สำคัญของประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2551) ซึ่ง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจึงเป็นเปอร์เซ็นต์สูงเนื่องจากเป็นแหล่งสะสมและแหล่งอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคนานาน เชื้อสามารถอาศัยอยู่ในเศษซากพืชและในดินได้นานข้ามฤดูปลูกโดยเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำคือ เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* มีลักษณะ โคโลนี สีเหลือง ขอบเรียบ กลม และจากการเก็บรวบรวมข้อมูลจากเกษตรกรที่เปิดเผยใหม่ที่ไม่มีการวัดเป็น โรคเน่าดำในพื้นที่มาก่อน พบว่าคะน้าที่ปลูกแสดงอาการลักษณะเน่าดำชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สามารถติดมากับเมล็ดได้ และก่อให้เกิดความเสียหายร้ายแรงเป็นประจำในช่วงฤดูปลูกที่มีความชื้นและอุณหภูมิสูง (Schaad and Alvarez, 1993) เมื่อจำแนกเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่แยกโดยใช้ 16s rDNA พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ 16s rDNA ของ เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ HRI 3811 (PHW 1205; race 1) (Valverde *et al.*, 2007)

เนื่องจากช่วงออกเก็บตัวอย่างโรคพบว่าสภาพอากาศช่วงเดือน เมษายน 2551- กันยายน 2553 มีความแปรปรวนสูงเป็นผลกระทบจากสภาวะโลกร้อน ส่งผลทำให้โรคเน่าดำมีความรุนแรงขึ้นและพบว่าศัตรูหลักของคะน้าคือ หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.) ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้คะน้าเกิดความเสียหาย (Stepanova, 1962) โดยพบว่าสามารถเก็บหนอนใยผักได้เป็นจำนวนมากจากแปลงเกษตรกร ในช่วงเดือน มีนาคมและเมษายน ของปีซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อนในภาคกลางของประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 40-41 องศาเซลเซียส (ข้อมูลพยากรณ์อากาศจากกรมอุตุนิยมวิทยาประเทศไทยในช่วงเดือนมีนาคม-

เมษายน, 2554) สอดคล้องกับความสามารถการเจริญเติบโตของหนอนใยผักไผ่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส โดยปกติช่วงเหมาะสมของการเจริญจะอยู่ระหว่าง 5-37 องศาเซลเซียส และพบว่าตัวเต็มวัยของหนอนใยผักไผ่ในแปลงปลูกคะน้าชอบหลบซ่อนตามซากพืชและวัชพืชที่เหี่ยวตกล้างอยู่ (Arkhipov, 1980) และมีนิสัยการเข้าทำลายคะน้าโดยกัดกินใบผักและแทะผิวใบด้านล่างแล้วทิ้งผิวใบด้านบนไว้ ทำให้ใบพืชมีลักษณะบางใสเป็นจุด ๆ ที่เรียกว่า windows (Hill, 1975) และจากการเก็บตัวอย่างโรคพบว่าช่อง windows ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเน่าดำเป็นช่องทางให้เชื้อสาเหตุโรคเน่าดำเข้าทำลายได้ง่ายมากขึ้น ซึ่งเห็นว่าจากการออกเก็บตัวอย่างโรคในช่วงเดือน มีนาคม-เมษายน ในแปลงคะน้าที่มีการระบาดของหนอนใยผักไผ่มากจะเจอใบคะน้าที่มีลักษณะอาการเน่าดำมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับวงจรสามเหลี่ยมโรคพืชที่ต้องมีสามปัจจัยเหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรค คือ อุณหภูมิร้อนในช่วงหน้าร้อน หนอนใยผักไผ่เปิดช่องทางให้เชื้อสาเหตุเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น และคะน้าที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของหนอนใยผักไผ่

จากการสอบถามในขณะออกเก็บตัวอย่างโรคเน่าดำและเก็บรวบรวมหนอนใยผักไผ่ได้สอบถามเกษตรกรเจ้าของแปลงคะน้าถึงเรื่องการควบคุมโรคเน่าดำและหนอนใยผักไผ่ของเกษตรกรส่วนใหญ่พบว่าเกษตรกรในพื้นที่ดังกล่าวนิยมใช้สารเคมีเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบสารพิษตกค้างในผักคะน้าสูงเป็นจำนวนมาก (สาวิตร และ คณะ, 2527) อีกทั้งการใช้สารเคมีฆ่าโรคและแมลงส่วนใหญ่ในแปลงคะน้าจะไปกระตุ้นให้แมลงเกิดการต้านทานสารเคมีทำให้การควบคุมโรค และแมลงดังกล่าวไม่ได้ผล ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของเกษตรกรเอง การควบคุมโรคโดยชีววิธีจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาผสมผสานปรับใช้ในระบบการผลิตคะน้า ในการควบคุมโรคและแมลง (Prathuangwong *et al.*, 2007) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลกะหล่ำดอก คุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชบริเวณรอบราก (Plant growth promoting) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชตระกูลกะหล่ำ และพืชอื่น ๆ ได้หลายชนิด (Prathuangwong *et al.*, 2009)

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบกลไกเชื้อ PGPR ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโดยการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำด้วยวิธี agar diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ซึ่งเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s มีกลไกในการสร้างสาร secondary metabolite หรือ สร้างสารปฏิชีวนะ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของ

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลายสายพันธุ์ที่มีรายงานสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (Pal and MaSpadden, 2006) มีหลายรายงานที่รายงานเกี่ยวกับสาร secondary metabolite เกี่ยวกับเชื้อ PGPR ในกลุ่มของ *Pseudomonas fluorescens* เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* F113 ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างสาร 2,4-diacetyl-phloroglucinol ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. (Shanahan *et al.*, 1992) ในขณะที่เดียวกันได้ทดสอบกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ SP007s โดยการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s พบว่าเชื้อ SP007s มีกลไกในการส่งเสริมความยาวรากสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตเมื่อคะน้ำอายุ 65 วัน และให้ผลผลิตคะน้ำได้สูงอย่างแตกต่างทางสถิติ เนื่องจาก SP007s เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณรอบ ๆ รากส่งผลทำให้จุลินทรีย์มีกลไกในการปรับตัวอย่างรวดเร็วและสามารถครอบครองที่บริเวณผิวรากพืชและเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่บริเวณรากได้ดีโดยจุลินทรีย์จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระยะกล้า อีกทั้งจะผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตชนิดเดียวกับที่พืชผลิตได้ เช่น ออกซิน จึงช่วยเพิ่มพูนการทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดี (สุดฤดี, 2551; Aino *et al.*, 1997) จึงยืนยันความสามารถของการเป็นเชื้อ PGPR ได้เป็นอย่างดี และได้ศึกษาโดยการพ่นใบ 3 ครั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในระดับต่ำแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดคะน้ำก่อนปลูกอย่างเดียว ซึ่งให้เห็นว่าการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบมีประสิทธิภาพดีกว่าซึ่งให้เห็นว่าเชื้อ SP007s มีกลไกของเชื้อปฏิปักษ์สามารถแข่งขัน(Competition) กับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า (Suwanto *et al.*, 1996) ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงมีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือ การแข่งขันโดยการแย่งแย่งอาหารเป็นลักษณะของ ที่จะไปลดปริมาณสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อโรค เนื่องมาจาก biocontrol agent เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารหรือมีความสามารถในการเจริญเร็วมาก ชนิดของอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดิน และพืชอาศัย ซึ่งได้แก่ ธาตุเหล็ก คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน และ micronutrient ซึ่งมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญบริเวณรากพืชได้รวดเร็ว และแย่งแย่งในตำแหน่งของการติดเชื้อ (site of infection) เป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งเชื้อที่ทำลายรากและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Weger *et al.*, 1987) และทำให้สามารถแย่งชิงสารอาหารเพื่อเปลี่ยนสารอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Bashan and Holguin, 1998)

งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่ควบคุมหนอนใยผัก ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมหนอนใยผักได้เป็นอย่างดี คือ เมื่อหนอนกักดินาในคะน้ำที่หุบเชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s พบว่าหนอนมีการตายหลังกินใบคะน้าที่ชุบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s และเข้าดักแด้เร็วกว่ากำหนด และผีเสื้อตัวเต็มวัยไม่ออกไข่ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s หรือ สาร secondary metabolite ของเชื้อ SP007s มีผลต่อระบบทางเดินอาหารของหนอนใยผัก และส่งผลต่อการวางไข่ของผีเสื้อตัวเต็มวัย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย recombinant *Pseudomonas* spp. กับ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนใยผักซึ่งมีขายในรูปแบบการค้าที่ประเทศอเมริกาโดยเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในระบบทางเดินอาหารของหนอนเชื้อจะมีการสร้างสปอร์และปล่อยสารพิษ α endotoxin ซึ่งมีผลต่อระบบทางเดินอาหารของหนอนใยผัก (Bruns and Abel, 2007)

จากการศึกษากลไกของเชื้อ SP007s ในด้านการควบคุมโรคเน่าดำและหนอนใยผักซึ่งให้ผลเทียบเท่าและดีกว่าสารเคมีควบคุมโรคและแมลง จึงพัฒนาให้เชื้อแบคทีเรีย SP007s อยู่ในรูปที่สะดวกต่อการใช้งาน และมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ จึงได้พัฒนาให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ชนิดผงที่สามารถละลายน้ำและนำไปใช้ได้ทันทีเหมือนสารเคมีในท้องตลาด โดยจะแบ่งการผลิตออกเป็น 2 ส่วน คือ การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเซลล์ SP007s และ การพัฒนาสารอาหารและสารพาที่สามารถเก็บรักษาเชื้อ SP007s ให้อยู่ในรูปที่เกษตรกรพร้อมใช้

การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s พบว่าได้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ ชื่อ SPMP medium (Soybean Potato-Modified for *Pseudomonas fluorescens* SP007s medium) มีส่วนประกอบของน้ำต้มกากถั่วเหลืองผสมมันฝรั่ง (1:0.5 กรัม) จากส่วนประกอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีทั้งแหล่งพลังงานที่สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปคาร์บอนและไนโตรเจน ที่มีความจำเป็นที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ (สมใจ, 2550) แหล่งพลังงานที่จะแปรูปเป็นไนโตรเจนที่ได้จากกากถั่วเหลืองส่วนใหญ่ใช้ไปในรูปของกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรียก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตเซลล์ให้มีจำนวนมาก อาหารเลี้ยงเชื้อจำเป็นอย่างยั้งที่จะต้องควบคุมให้อัตราคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้อยู่ในระดับที่พอดีที่แบคทีเรียใช้แล้วเกิดประโยชน์สูงสุด และผลการทดลองพบว่า pH ที่เป็นกลางเหมาะสมที่สุดที่สามารถช่วยให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่าเป็น pH ที่ตรงกับความต้องการของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* (Aharonowitz and demain, 1979; kanoksilapathum, 1981; Iwai and omura, 1982)

งานวิจัยได้นำเซลล์แบคทีเรียเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหาร SPMP ผสมกับผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ คือ KUwin/Gap SP007s ที่ได้มีการ

เลือกวัตถุดิบของ kaolin : lactose : alkylamine ethoxylates : SiO_2 : CaSO_3 : CMC : FeSO_4 = 70: 14: 8: 5:1:1:1 นน./นน. นำมาผสมเป็นสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพ เพื่อรักษาและส่งเสริมประสิทธิภาพ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ที่ดีที่สุด จากการเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของสารพาลหลักคือ ดินขาว เปรียบเทียบกับทลคัม เหตุผลที่เลือกดินขาวเนื่องจากดินขาว จะมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 222.12 gm ซึ่งเบากว่าการใช้ทลคัม น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 379.27 gm ความเบาจะช่วยให้เกิดการกระจายตัวได้อย่างรวดเร็วมากขึ้นในตรงกันข้ามทลคัมยังเกิดการจับเกาะ กลุ่มบนน้ำทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ไม่สามารถละลายออกจากสารพาได้ ส่งผลให้จำนวนจุลินทรีย์มีปริมาณไม่เพียงพอเพียงพอในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ อีกทั้งพบว่า ดินขาวสามารถแพร่กระจายได้ดีกว่าทำให้การเกาะบนใบพืชสามารถเคลือบใบพืชและเคลือบเมล็ดได้ อีกว่าทลคัมโดยการเคลือบใบพืชจะช่วยให้การเกาะติดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ได้อีกหนึ่งหนทาง (Greg *et al.*, 2003) สารอาหารที่จะนำมาเป็นพลังงานซึ่งพบว่าสามารถใช้ น้ำตาลชนิดที่มีโมเลกุลคู่ทั่วไปที่สำเร็จรูปมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s มี metabolism ที่ช้าเนื่องจากต้องการการเปลี่ยนน้ำตาลให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้ การ เปลี่ยนน้ำตาลนี้เป็นผลให้ไม่เกิดของเสียเกิดขึ้นในสารพาทำให้เซลล์ที่ได้อยู่ในระยะปลอดภัยได้นาน ที่สุด (Burges, 1998) สาร deshecofix เป็นสารที่เพิ่มประสิทธิภาพของสารพาให้ได้ผลดียิ่งขึ้นช่วยมีการ แพร่กระจายลงในหลังจากสารตกกระทบลงผิวน้ำทันทีและมีการกระจายจากด้านบนลงสู่ด้านล่างและ จากด้านล่างพุ่งขึ้นสู่ด้านบนอีกครั้ง (คำแนะนำจากบริษัทแก๊พอินดัสตรี) การใส่สารเคลือบผิว คาร์บอนเพื่อช่วยการจมตัวของผลิตภัณฑ์มวลรวมทำให้จมลงได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากผลิตภัณฑ์ ดังกล่าวมีการใส่ผง silica เพื่อเป็นตัวดูดและลดความชื้น (คำแนะนำจากบริษัทแก๊พอินดัสตรี) การใส่ สาร CMC เพื่อการปกป้องเซลล์เนื่องจาก CMC มีคุณสมบัติสร้างเส้นใยเครือข่ายห่อหุ้มเซลล์เพื่อ ป้องกันการกระแทกของเซลล์โดยตรงที่เกิดจากการเสียดสีที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ (Thomas and Katy, 1999) และเหล็กที่ใส่ไปจะช่วยเซลล์จะมีประโยชน์เมื่อไปตกอยู่ในแปลงเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s สามารถเปลี่ยนเหล็กที่มีอยู่ในรูปที่มีประโยชน์ต่อพืช (สุตฤดี, 2551) และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเพื่อเป็นสารพามีความชื้นอยู่ระหว่าง 7-14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสม ในการพักตัวในรูปผลิตภัณฑ์ของเซลล์ อีกทั้งค่าความเป็นกรดเบสหลังจากที่ผสมสารครบพบว่ามีค่า เป็นกลางอยู่ในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ชนิดนี้ชอบ และพบว่าการเก็บรักษา ไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เป็นการรักษาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ให้อยู่ในปริมาณครบถ้วนที่สุด เนื่อง จากเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะพักตัวไม่เกิดการขับถ่ายของเสีย เกิดขึ้น และการเก็บในอุณหภูมิห้องพบว่าการลดจำนวนของปริมาณเซลล์เมื่ออายุผลิตภัณฑ์ 11 เดือน

เนื่องจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงขึ้นลงในสภาพอุณหภูมิห้องทำให้เกิดการตายของเซลล์เพราะไม่สามารถปรับตัวได้ หรืออาจเป็นเพราะคุณภาพของสารพดงกล่าวเสื่อมประสิทธิภาพเนื่องจากการเก็บรักษาที่ยาวนาน

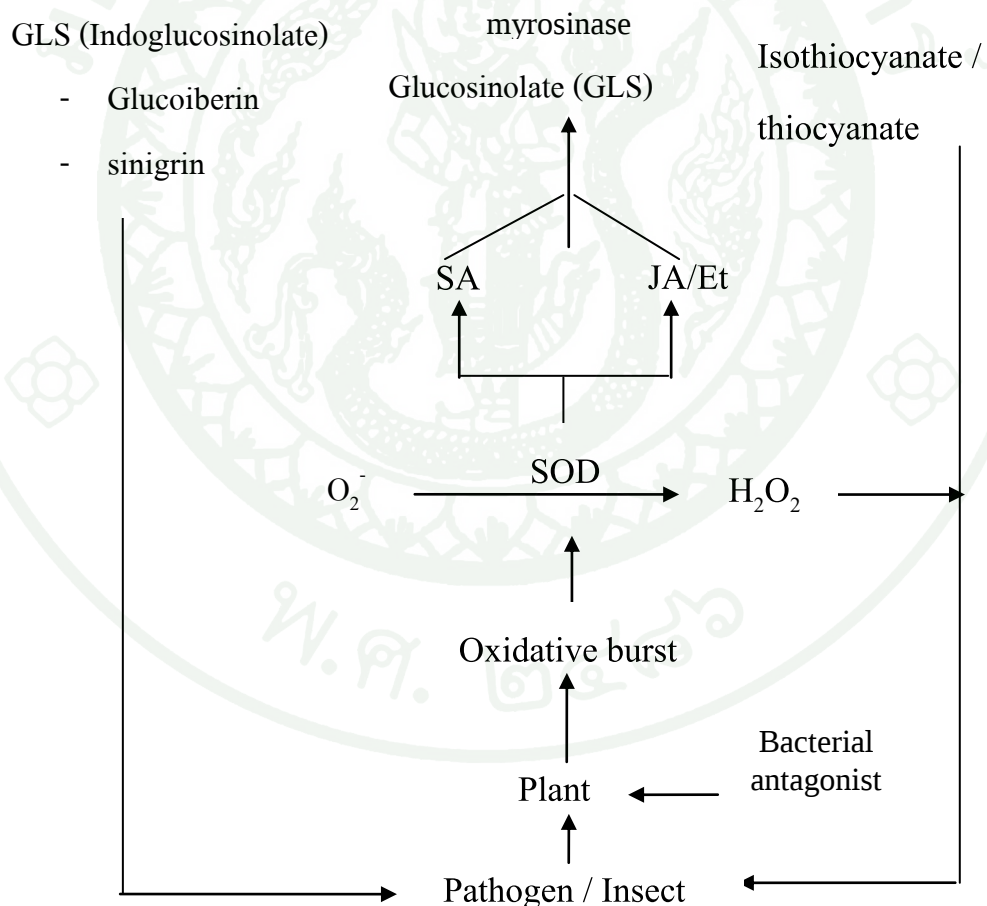
จากการศึกษากลไกการชักนำให้คะน้ำเกิดความต้านทานโรคและแมลง (Induced disease resistance) โดยจะเป็นกลไกที่สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างสารปกป้องตนเองได้เพิ่มมากขึ้นในช่วงหลังจากใช้เชื้อปฏิปักษ์แล้วมีเชื้อโรคเข้าทำลาย (สุดฤดี และคณะ, 2548) งานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ที่เกิดขึ้นหลังจากปลูกเชื้อโรคและแมลงทดสอบในคะน้ำที่ผ่านการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s (KUwin/Gap SP007s) คลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง ผลจากการทดลองพบว่าคะน้ำมีการสะสม SOD เพิ่มขึ้นหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคและหลังจากการปล่อยหนอนไผ่ฝัก ทั้งที่ทดสอบในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ สอดคล้องกับปฏิสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคกับพืชอาศัยที่เกิดปฏิสัมพันธ์บริเวณตำแหน่งจุดติดเชื้อ คือ จะเกิดห่มุ ออกซิเจนสปีชีส์ (ออกซิเจนอิสระ) ซึ่ง SOD มีการเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) ไฮดรอกซิลอิสระ (OH) และ O_2^- ไม่เสถียรเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในเซลล์ของพืชทำให้ hydrogen peroxide ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงมีผลในการฆ่าเชื้อสาเหตุโรค (Baker and Orlandi, 1995; Delhomez *et al.*, 1995) ซึ่งการทดลองนี้ไม่ได้ใช้คะน้ำพันธุ์ต้านทาน แต่ใช้จุลินทรีย์ชักนำภูมิต้านทาน ซึ่งเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ดังกล่าวสามารถแสดงได้ว่าการควบคุมโรคและแมลงแบบชีวภาพโดยใช้เชื้อ PGPR สามารถชักนำภูมิต้านทานให้พืชมีศักยภาพทัดเทียมกับพืชสายพันธุ์ต้านทานอย่างมีประสิทธิภาพ (Stephane *et al.*, 2005) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ชักนำให้พืชสร้างสาร SOD เพิ่มขึ้นเพื่อไปกระตุ้นให้พืชเกิดปฏิกิริยาตอบโต้หลังจากเชื้อสาเหตุโรคและหนอนไผ่ฝักเข้าทำลาย โดยปฏิกิริยาดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงในห่มุ ออกซิเจนอิสระดังกล่าว ทำให้เซลล์บริเวณนั้นเป็นพิษหรือมีค่าความเป็นกรดเบสสูงจนทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถครอบครองหรือติดเชื้อบริเวณจุดติดเชื้อแรก (Govrin and Levine, 2000) สอดคล้องกับผลการตรวจสอบในระดับสรีระวิทยาหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคและปล่อยหนอนไผ่ฝักทำให้ผลการเกิดโรคและหนอนไผ่ฝักลดลงแปรผันตรงข้ามกับเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s มีกลไกการชักนำให้พืชเกิดการต้านทานโรคโดยผลิตสาร SOD ฆ่าศัตรูคะน้ำ

งานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาถึงสาร glucosinolate ซึ่งพบมากในพืชตระกูลกะหล่ำและพบว่าเมื่อมีสถานะเครียดกดดันจะทำให้เอนไซม์ myrosinase ทำงานเพื่อย่อยสาร glucosinolate ให้อยู่ในรูปของ

สารระเหย ที่เรียกว่า isothiocyanate ซึ่งมีความเป็นพิษต่อโรคและแมลง ได้ทดสอบการควบคุมโรคและแมลงในเบื้องต้น คือ ใช้สาร isothiocyanate ในรูปแบบสารสังเคราะห์ยังเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี agar diffusion และวิธีที่ใช้น้ำสกัดพืช (คาดว่ามีการ glucosinolate) ผสมด้วยเอนไซม์ myrosinase และได้เชื้อสาเหตุโรคลงไป พบว่าทั้งสารสังเคราะห์และน้ำสกัดพืชที่ทดสอบสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำได้อย่างแตกต่างทางสถิติ (นลินา และคณะ, 2552) จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวจึงได้ทำการทดสอบกับค่น้ำสายพันธุ์บางบัวทอง 35 คลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่นตาม 3 ครั้ง ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s (KUwin/Gap SP007s) โดยทดสอบที่สภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ ซึ่งพบสาร glucosinolate จะมีค่าสูงขึ้นหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคและหลังจากหนอนก่อกิน และพบว่าการสะสมอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ซึ่งให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s สามารถชักนำภูมิคุ้มกันที่พืชมีอยู่เดิมให้เพิ่มขึ้นได้โดยใช้กลไกในการชักนำภูมิคุ้มกันที่สอดคล้องกับรายงานที่ว่าเชื้อแบคทีเรีย PGPR *Pseudomonas* spp. ใช้ยีน *Flg22* ที่ควบคุมการทำงานของ flagellin เป็น elicitor ชักนำให้พืชเกิดการสร้างสาร glucosinolate (Nicole *et al.*, 2009) และผลการทดลองยังพบอีกว่าจะมีการชักนำให้เกิดการสร้างมากขึ้นหากมีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำโดยจะมีการสะสมเพิ่มขึ้นทันทีที่สะสมไปจนกระทั่งสูงสุดและกลับเข้าสู่ภาวะสมดุล การเปลี่ยนแปลงของปฏิปักษ์ดังกล่าวสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Buensanteai *et al.* (2008) อธิบายได้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถใช้กลไกในการชักนำภูมิคุ้มกันโรคสามารถกระตุ้นโดยใช้ signal molecule ทั้งสองชนิด คือ salicylic (SA) และ jasmonic (JA) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันค่น้ำให้สร้างสาร glucosinolate (Craig and Sam, 2002) ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของสาร glucosinolate ที่มีผลต่อโรคเน่าดำ พบว่าความสำคัญดังกล่าวสามารถนำไปเป็นเครื่องมือในการควบคุมโรคแบบชีววิธีที่ให้ผลเหมือนกับสายพันธุ์ด้านทานที่มีสารนี้มากพอแล้ว (Craig and Carl, 2002) และสามารถสรุปได้ว่าสาร glucosinolate ที่เพิ่มมากขึ้นสอดคล้องกับกลไกในการชักนำภูมิคุ้มกันและสามารถเป็นแบคทีเรียที่เข้าไปอยู่ในพืช (endophyte) และเป็นแบคทีเรียที่อยู่รอบ ๆ พืช (epiphyte) ที่สามารถชักนำให้พืชด้านทานโรคได้หลายชนิด (Bloembergen and Lugtenberg, 2001) และส่งผลให้เชื้อ PGPR สามารถที่จะชักนำหรือกระตุ้นโดยใช้ระบบการชักนำภูมิคุ้มกันแบบจุดตำแหน่งนั้น local หรือ สามารถชักนำภูมิคุ้มกันทั่วต้นค่น้ำแบบ induce resistance

จากการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูกร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง และเปรียบเทียบระหว่างการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปเชื้อสด และการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ที่อยู่ในรูป

ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ ISR-P® ที่มี Talcum เป็นองค์ประกอบหลักและ KUwin/Gap SP007s ที่มี Kaolin เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ KUwin/Gap SP007s ให้ประสิทธิภาพดีกว่าทั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรค อีกทั้งยังให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเนื่องการใช้ผงเคลือบเมล็ดส่งผลให้เชื้อปฏิปักษ์สามารถเกาะกับเมล็ดค่น้ำได้ดีกว่าการคลุกด้วยเซลล์ suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรง และสารพาที่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์มีส่วนช่วยในการทำงานของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ได้มากขึ้นคือ การเคลือบใบ การกระจายตัวของจุลินทรีย์ในน้ำ การมีชีวิตในระยะการเก็บรักษาในช่อง การเก็บรักษาที่สะดวกมากขึ้น ซึ่งตรงตามคุณสมบัติที่ดีที่ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควรมี (Greg *et al.*, 2003) และที่สำคัญพบว่าผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่สามารถเก็บรักษาได้ยาวนานและมีต้นทุนถูกกว่า 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เดิม ISR-P® อีกทั้งมีกลไกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยสามารถสรุปได้ดังไดอะแกรมภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ไดอะแกรมแสดงกลไกการเกิด Superoxide dismutase และ glucosinolate หลังจากปลูก โรค และถูกหนอนเข้าทำลายในพืชผ่านการคลุกเมล็ดร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s

สรุป

จากการรวบรวม แยกเชื้อ และจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ แหล่งผลิตค่น้ำจากจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี อ่างทอง และสุพรรณบุรี ที่มีลักษณะอาการขอบใบเหลืองลูกกลมเข้าเส้นกลางใบเป็นรูปตัววี (V-shape) มีทั้งหมด 191 ตัวอย่าง มีสาเหตุจาก *X. campestris* pv. *campestris* ที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน กลมมน ขอบเรียบ ผิวเรียบ เป็นมัน พิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Koch's postulation ทดสอบคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาเซลล์ตายอย่างเฉียบพลัน ทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุลโดยใช้ primer ของ 16s rDNA เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ HRI 3811 มีเพียง 125 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติตรงตามหลักการจำแนกแบคทีเรียของ Bergy Manual's ทุกประการ และดำเนินการโดยส้อมเก็บตัวแทนหนอนใยผักในแปลงเก็บโรคเน่าดำ หนอนใยผักจะมีลักษณะลำตัวยาวเรียวยาวหัวท้ายแหลม ส่วนท้ายมีปุ่มยื่นออกเป็น 2 แฉก สีเขียวอ่อน หรือเขียวปนเหลืองเมื่อถูกตัวหนอนจะคืนและทิ้งตัวลงดินโดยการชักใย เข้าดักด้วโดยมีใยปกคลุม ทั้งนี้หนอนที่เก็บรวบรวมได้นำมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการเลี้ยงหนอน โดยใช้กล่องและกรงเลี้ยงหนอนและให้ใบพืชค่น้ำเป็นอาหารจนพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษากลไกการทำงานของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s สามารถสรุปคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s นี้ออกเป็น 4 ข้อ คือ 1. การแก่งแย่งแข่งขันในการหาอาหาร (competition) 2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (ให้ค่าการยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion) 3. การส่งเสริมการเจริญเติบโต (ให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตหลังจากการคลุกเมล็ดสูงสุดในทุกการทดสอบ) 4. การชักนำภูมิคุ้มกัน (induce resistance) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s สามารถชักนำกิจกรรมของ superoxide dismutase (SOD) และ glucosinolate ในค่น้ำให้เพิ่มขึ้นหลังเชื้อสาเหตุโรคและแมลง

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s ที่ตรวจสอบสารชักนำภูมิคุ้มกัน superoxide dismutase และ glucosinolate ที่ตรวจสอบกิจกรรมของสารที่เกิดขึ้นในสภาพเรือนทดลองที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ/ปล่อยหนอนใยผักและสภาพไร่ ที่มีการเกิดโรคและแมลงเข้าทำลายตามธรรมชาติ (natural infection) เมื่อคลุกเมล็ดก่อนปลูกร่วมกับการพ่นใบ 3 ครั้ง ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s คือ superoxide dismutase (SOD) (ในสภาพเรือนทดลอง โรคและแมลง; สภาพไร่ เพิ่มขึ้น 1.8 1.7 ; และ 2 เท่า ตามลำดับ) และ glucosinolate (ใน

สภาพเรือนทดลอง โรคและแมลง; สภาพไร่ เพิ่มขึ้น 3.5 3.1 ; และ 3.6 เท่า ตามลำดับ) สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s สามารถชักนำให้กะหล่ำมีกิจกรรม SOD และ glucosinolate เพิ่มขึ้นและยับยั้งการเข้าทำลายของศัตรูกะหล่ำ ดังนั้นการตรวจสอบกิจกรรม SOD และ glucosinolate สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบการวัดการต้านทานโรคและแมลงได้

งานวิจัยนี้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ชื่อ KUwin/Gap SP007s ซึ่งมีส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ดังนี้ คือ Kaolin : Alkylakalia : SiO_2 : CaCO_3 : lactose : CMC : FeSO_4 (70:8:5:14:1:1 นน/นน) โดยผสมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (3×10^{13} cfu/มิลลิลิตร) ที่เลี้ยงในอาหารชนิดใหม่ที่ผลิตขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s คือ SPMP medium (Soybean Potato Modified for *P. fluorescense* SP007s) เป็นการพัฒนาต่อจากผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์เดิม คือ ISR-P® เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์สด พบว่าส่วนผสมใหม่ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s สามารถส่งเสริมและช่วยให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s เก็บรักษาได้นานและมีประสิทธิภาพการควบคุมสูงสุดเต็มตามศักยภาพ คือ ลดการเกิดโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญให้ผลผลิตสูงสุดแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์เดิม (ISR-P®) และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescense* SP007s ในรูปแบบเซลล์สด และมีต้นทุนการผลิตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์เดิม คือ ISR-P® เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

การปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำ ในสภาพเรือนทดลองควรปรับสภาพแวดล้อมให้มีความชื้นประมาณ 80-100% โดยใช้ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ ใ้ส่กระถางปลูกลงไป และควรปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าดำในเวลา 15.00 – 16.00 น. ในวันที่มีอากาศร้อน และการปลูกโรคเน่าดำในสภาพไร่ โดยสุมปลูกโรคเป็นจุด 5 จุดเป็นรูป W โดยแต่ละจุดปลูกโรค 3 ต้น โดยการพ่นเชื้อ *X.campestris* pv. *campestris*

ในการทำอาหารเพิ่มปริมาณหลังจากต้มสกัดกากถั่วเหลืองและมันฝรั่งแล้วกรอง ควรนำน้ำสกัดผสมกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนกากถั่วเหลือง และมันฝรั่งนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* SP007s เกาะและชิมเข้าทั่วถึงทุกอนุภาคของผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะให้ผลดีกว่าการพ่นด้วย foggy ในถุงพลาสติกแล้วเขย่า

ในการเตรียมสกัดสาร glucosinolate เพื่อนำไปฉีดในเครื่อง HPLC หลังจากใส่สาร sulfatase แล้วทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นควรล้างผ่านน้ำ 3 มิลลิลิตร โดยผ่านเครื่องละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละครั้งมาผสมกันก่อนฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC

การใช้ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s ในสภาพไร่ ควรพ่นในเวลาตอนเย็นและคำนึงถึงค่า economic threshold (Et) ในการควบคุมแมลง (ตามหลักของกรมวิชาการที่มีรายงานในปัจจุบัน) หากเกินค่า Et ควรใช้สารเคมีควบคุมก่อนเกิดการระบาดของโรคและแมลงจนไม่สามารถควบคุมได้ จะทำให้การใช้ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ควรมีการศึกษาเพิ่มในเรื่อง quantitative glucosinolate ที่ volatile และ isoform ปริสุทธิ ยับยั้งโรค/แมลงได้จริง (exogenous form สกัดออกมาวิจัยผลได้) และชี้ glucosinolate / SOD เป็นมหาสูตรเพื่อตรวจสอบพันธุ์ด้านทานในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* กับ geography อาการโรค พันธุ์พืช ฯลฯ และผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ Bio-formulation ที่พัฒนาใหม่ควรศึกษากับพืชเศรษฐกิจอื่นและต่างพื้นที่ต่อไปด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกษม พิลีก. 2524. **ผักกาดและผักกะหล่ำ**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไฉน ยอดเพชร. 2542. **พืชผักในตระกูล cruciferae**. คณะเกษตร บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ชลบุรี.

ชาญรงค์ ดวงสะอาด. 2550. **แมลงศัตรูผัก**. ศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีววินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. แหล่งที่มา: http://www.mju.ac.th/nbcrc/data/44/data01_44.doc, 1 มีนาคม 2550.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์สำหรับการทวีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KPS46, น. 127-135 ใน **รายงานการประชุมวิชาการอรัญญาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7**, 2-4 พฤศจิกายน 2548. เชียงใหม่.

ติยากร ฉัตรนภารัตน์ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. วิธีการใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* SP007s เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้า, น. 289-298 ใน **รายงานการประชุมวิชาการอรัญญาพืช ครั้งที่ 8**, 20-22 พฤศจิกายน 2550. พิษณุโลก.

ติยากร ฉัตรนภารัตน์ สุพจน์ กาเข้ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคเน่าดำคะน้า. น. 563-571 ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46**, 29 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2551. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ.

ไทรรัตน์ หนูเอียด. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากค้ำคาวดำและพามีในการควบคุมหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) และเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2533. นิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโรคลำไส้. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประยูร สัมฤทธิ์ และ อาสา เขตแดน. 2528. การศึกษาหาช่วงระยะเวลาการปลูกพืชตระกูลกะหล่ำที่
เหมาะสม. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ยุพยงษ์ ทิพลิงห์. 2546. ค่น้ำ. แนะนำอาชีพพูดทำมาหากินในท้องถิ่นสยาม. กรุงเทพฯ. 48 น.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒินิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม, ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ, และ สุด
ฤดี ประเทืองวงศ์. 2549. การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิต้านทานโรคของกะหล่ำ
ดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ, น. 795-810 ใน เอกสาร
ประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์
2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, สุพจน์ กาเข้ม, และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่
มีประโยชน์ร่วมกับสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิ
ต้านทานโรคของการผลิตกะหล่ำดอกในสภาพไร่, น. 357 - 363 ใน เอกสารประกอบการ
ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. ผลกระทบของการใช้จุลินทรีย์คุมโรคต่อ
โครงสร้างแบคทีเรียบางกลุ่มในดินปลูกกะหล่ำดอก, น. 257-245 ใน รายงานการประชุม
วิชาการอรัญญาพิช ครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550. พิษณุโลก.

_____ และ _____. 2551. ความถี่และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรีย
ที่มีประโยชน์เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพการควบคุมโรคสำคัญของกะหล่ำดอก, น. 572 – 580 ใน
เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. 29 มกราคม- 1
กุมภาพันธ์ 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ. 2551. การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมโรคเน่าและของกะหล่ำดอกและการประเมินความเสี่ยง. วารสาร โรคพืช. 21(1-2): 63-78.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2527. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตร วรรณพิน วิภา หงส์ตระกูล และเสริม สีมา. 2527. การวิจัยการสลายตัวของมาลาไทยออนในผักคะน้าเพื่อกำหนดค่าสูงสุดของสารพิษตกค้าง. รายงานการวิจัยปี 2527: ไม้ผล พืชผักและเห็ด กรุงเทพฯ. ไม้ดอกไม้ประดับพืชสวนอุตสาหกรรม มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน พืชที่สูง พืชสมุนไพรไทยและเครื่องเทศ. 172 น.

ลัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2544. สรีรวิทยาการพัฒนาพืช. สำนักพิมพ์คลังนานาวิทยา, กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แบคทีเรียที่สร้างเสริมความมั่นคงปลอดภัยทางอาหารด้านพืชอย่างยั่งยืน. หน้า 58-66. ใน วารสารวิชาการ 25 ปี สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ, สุพจน์ กาเข้ม, และ จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์. 2550. โปรแกรมการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อการผลิตพืชตระกูลกะหล่ำคุณภาพที่กาญจนบุรี, น. 405-421 ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550. พิษณุโลก.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรค. เกษตรกรรมธรรมชาติ. กรุงเทพฯ. น.32.

สมใจ ศิริโชค. 2550. อาหารเลี้ยงเชื้อ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, น. 340: 80-96.

สุพจน์ กาเข้ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2544. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองที่ดัดเทียมสารเคมี, น. 237 – 248. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 254. โรงแรมเฟลิทซ์ริเวอร์แคว. กาญจนบุรี.

สุพจน์ กาเข้ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากผิวใบและดินบริเวณรากถั่วเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลือง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หฤษฎ์ นิมรักษา. 2551. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งที่จากรา *Alternaria solani* Sorauer. **วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนันต์ วัฒนชัยกรรม. 2521. หนอนใยผัก. **บทความรู้ทางการเกษตร เผยแพร่ทางสถานีวิทยุกระจายเสียง เล่ม 3**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. น. 2.

อุไรจนา กสิกรรมพิบูลย์. 2543. ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากและดินปลูกมะเขือเทศในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (*R. solanacearum*). **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abadias, M., A. Benabarre, and N. Texiid. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Inter J. food micro.** 65: 173-182.

Aharonowitz, Y. and A.L. Demain. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of Cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **J. Microbial** 25: 61-67

Arkhipov, G.E. 1980. The cabbage moth. **Rev.Appl. Entomol. Ser.A.** 69:391

Aino, M., Y. Maekawa, S. Mayama, and H. Kato. 1997. **Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonads**, p. 120–123. In A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino (ed.), *Plant growth promoting rhizobacteria: present status and future prospects*. Nakanishi Printing, Sapporo, Japan.

Babitha, M. P. S. G. Bhat, H. S. Prakash and H. S. Shetty. 2002. Differential induction of

superoxide dismutase in downy mildew-resistant and-susceptible genotypes of pearl millet.

Plant Pathol. 51: 480-486.

Baker CJ and Orlandi EW. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu Rev Phytopathol** 33: 299-321.

Bashan, Y., and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growthpromoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biol. Biochem.** 30:1225–1228.

Behrouz Ehsani-Moghaddam, Marie The're'se Charles, Odile Carisse, and Shahrokh Khanizadeh. 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. **Plant Physiology** 163: 147-153

Beekhuis, H.A. 1975. Technology and Industrial Applications. **Chemistry and biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives**. Newman, A.A. Ed.; Academic Press: London.

Blaney, W.M., M.S.J. Simmonds, S.V. Evans, and L.E.Fellows. 1984. The role of the secondary plant compound 2,5-dihydroxymethyl 3,4 dihydroxypyrrolidine as a feedinginhibitor for insects. **Entomol.** 36: 209-216.

Bloemberg, G. V., and B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Plant Biol.** 4:343–350.

Brown. J., and M.J. Morra. 2005. Glucosinolate-Containing seed meal as a soil amendment to control plant pests. Operated for the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy by Midwest Research Institute. 99 p.

Borek, V., M.J. Morra, P.D. Brown and J.P. McCaffrey. 1994. Allelochemicals produced during

sinigrin decomposition in Soil. **Agric. Food Chem.** 42:1030-1034.

Bruns, H. A., and C. A. Abel. 2007. Effects of nitrogen fertility on Bt endotoxin levels in maize. **Entomological Science**, 42: 35-43.

Buensanteai, N., D. Athinuwat, T. Chatnaparat, G.Y. Yuen, and S. Prathuangwong. 2008. Extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced systemic resistance on soybean. **J. Kasetsart.** 42: 13-26.

Burges.H.D. 1998. Beneficial microorganism, nematode and Seed treatments. **Formulation of Microbial Biopesticides**. 289 p.

Campbell, R. 1989. **Biological control of microbial plant pathogens**. Cambridge University Press, Cambridge.

Choesin, D.N., and Boerner, R.E.J. 1991. Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica-napus* (Brassicaceae). **J. Bot.** 78 (8): 1083-1090.

Cook, R.J., and K.F. Baker. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Craig, S.C., and C. E. Sam. 2002. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica Group) on growth of *Pseudomonas marginalis*, acausal agent of bacterial soft rot. **J. Plant disease**. 629-632.

Delp, B.R., L.J. Stowel, and J.J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathol.** 76: 1299-1305.

- Delahaut, K.A., and Newenhouse, A.C. 1997. **Growing broccoli, cauliflower**, cabbage and other colecrops in Wisconsin :A guide for fresh-market growers.University of Wisconsin-Extension.23 pp.
- Delhomez, N., O Carisse, M. Lareau, and S.cKhanizadeh. 1995. Susceptibility of strawberry cv and advanced selection to leaf spot caused by *Mycosphaerella fragariae*. **HortScience** 30:592–5.
- Dustman, R.B., and Duncan, I.J. 1940. Effect of certain thiocyanate sprays on foliage and fruit in apples. **Plant Physio.** 15: 343-349.
- Fenwick, G.R., R.K. Heaney., and W.J. Mullin. 1983. Glucosinolates and their Breakdown products in food and food plants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 18: 123-201.
- Fravel, D.R., J.A. Lewis, and J.L. Chittams. 1995. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathol.** 85 : 165-168.
- Hammersmidt, R. 1996. Phytoalexin : What have learned after 60 years ? Annual Review of **Phytopathol.** 37: 285-306.
- _____, E. M. Nuckles, and J. Kuc. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Pl. Pathol.** 20: 73–82.
- Hill, D.S. 1975. **Agricultural insect pests of the tropic and their control**. Department of Zoology, University of Hong Kong. Cambridge University Press.
- Iwai, Y., and S. Omura. 1982. Culture condition for screening of antibiotics. **J. Antibiotics.** 35:123
- Kamoun S., HV. Kadmar, E. Tola and CI. Kado. 1992. Incompatible interaction between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the hrpX

locus. **Molecular Plant-microbe Interactions** 5: 22–33

Kanoksilapathum, W. 1981. Studies on antibiotic production by Streptomycetes and especially a Streptovercillium species. **M.S. Thesis, Mahidol University**, Bangkok.

Klaus Apel, and Heribert Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant boil.** 55: 373-99.

Kloepper, J.W. 1992. Plant growth – promoting rhizobacteria as biological control agents. **Soil Microbial.** Marcel Dekker. Inc., Wasington. pp. 255-265.

Levy, E., Z. Eyal, I. Chet, and A. Hochman. 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. **J. Physiology of plant.** 40: 163–71.

Lichtenstein, E.P., D.G. Morgan, and C.H. Mueller. 1964. Naturally occurring insecticides in cruciferous crops. **J. Agricultural. Food Chem.** 12: 158-161.

Lisansky, S. G. 1985. Production and commercialization of pathogens. **In: Biological Pest Control**, (ed. by N. W. Hussey and N. Scopes). Poolc. UK: Blandford Press. pp. 210-218

Isshiki, K. K. Tokuoka, R. Mori, and S. Chiba. 1992. Preliminary examination of Allyl isothiocyanate vapor for Food Preservation. **J. Biochem.** 56:1476-1477.

George Rice. 2004. **DNA extraction.** Montana State University. <http://serc. Carleton. Edu/microbelife/research-methods/genomics>.

Govrin EM, and A. Levine. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Curr Biol.** 10:751–756.

Greg Volgas, Roger Dowheer, and Humberto Lopez. 2003. **Pesticids formulations and application.**

system. 261 p.

Manici, L.M., L. Lazzeri, and S. Palmieri. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolate and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. **J. Agriculture Food Chemistry** 45: 2768-2773.

_____, G. Lazzeri, O. Baruzzi, S. Leoni and S. Palmieri. 2000. Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in Sterile Soil. **Pest Manag. Sci.**, 56: 921-926.

Mojtahedi, H., G.S. Santo, A.N. Hang and J.H. Wilson. 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. **J. Nematol.** 23: 170-174.

Nicole K. Clay, Adewale M. Adio, Carine Denoux, Georg Jander, and Frederick M. Ausubel 2009. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. **Science**. 323: 5910 95-101

Pal, K.K., and B. McSpadden Gardener. 2006. **Biological control of plant pathogens**. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Prathuangwong, S., S. Kasem, N. Thaveechai, and S. Tsuyumu. 2000. Evaluation of thermotolerant bacteria from soybean phyllospheres and rhizospheres for secondary metabolite production and biological control of soybean bacterial pustule. Abstr. of the 2nd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermoterant Microbial Resources and Their Applications, Nov. 21-25, 2000. Yamaguchi. 69 (04-5).

Prathuangwong S., W. Chuaboon, S. Kasem, V. Pitiyont, B. Pitiyont, N. Hiromitsu and K. Suyama. 2007. Integrating bacterial antagonist and plant extract for managing disease and insect of Chinese kale. **Proc. of the ISSAAS International Congress, Agriculture is a Business**.

Dec.12 -14, 2007. Melaka.

Prathuangwong, S., W. Chuaboon, S. Kasem, N. Hiromitsu and K. Suyama. 2007. Formulation development of *Pseudomonas fluorescens* SP007S to control chinese kale diseases in farming production. **Proc. of the ISSAAS International Congress, Agriculture is a Business.** Melaka.

Prathuangwong, S., W. Chuaboon, T. Chatnaparat, V. Pitiyon, B. Pitiyon, S. Uraichen and D. Suwankul. 2009. Development of a raduce use pesticide program for the sustainable management of disease, insect and weed on Chinese kale. **Proc.of the ISSAAS Internayional Congress.** Thailand.

Prathuangwong, S, W. Chuaboon, S. Kasem, D. Athinuwat, K. Suyama and H. Negishi. 2009b. Potential for application time of *Pseudomonas fluorescens* SP007s and biofertilizer for Alternaria leaf spot management of Chinese kale . **Proc.of the ISSAAS International Congress.** Thailand.

Pitcher, L., H., E. Brennan, A. Hurley, P. Dunsmuir, J. M. Tepperman, and B. A. Zilinskas, 1991. Overproduction of petunia copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance In transgenic tobacco. **Plant Physiol.** 97:452-455.

Prathuangwong, S., W. Chuaboon, J. Thowthampitak, N. Thaveechai, B. Pitiyon, V. Pitiyon and S. Uraichuen. 2009c. Integrated pest management using bioproduct for Chinese kale production. **Proc.of the ISSAAS International Congress.** Thailand.

Rimmer R.S., V.I. Shattuck, and L. Buchwaldt. 2006. **Compendium of brassica disease.**The American Phytopathological Society. USA.

Roberts, S. J. and Koenraad, H. 2007. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on

Brassica spp. **Annexe to chapter: Seed Heath Methods: 7-019-2. Switzerland.**

Rosa, E.A., S. Heaney, G.R. Fenwick, and C.A.M. Portas. 1997. Glucosinolates in crop plants. **Hort. Rev.** 19:99-215.

Ruud V., D. Matthijs., M. Wim., and F J. Wim. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of vegetables. **J. Food and Agriculture.**

Rubatzky, V.E., and M. Yamaguchi. 1997. **World Vegetables. International Thomson Publishing. Department of Vegetable Crops, University of California, Paris.**

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of **American Phytopathological Society**, St. Paul MN.

Shanahan, P., D. J., O'Sullivan, P. Simpson, , J. D. Glennon and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:353-358.

Siemonsma, J.S., and K. Piluek. 1994. **Plant resources of south-east Asia.** Bogor Indonesia. No.8.

Smelt, J.H., S.J.H. Crum, and W. Teunissen. 1989. Accelerated transformation of the fumigant methyl isothiocyanate in soil after repeated application of metham-sodium. **Environ. Sci. Health.** 24: 437-455.

Stepanova, L. A. 1962. An experiment in the ecological analysis of the conditions for the development of pests of cruciferous vegetable crop in nature. **Rev.Appl. Entomol.** 172p.

Suslow, T.V, and M. N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopatho.** 72: 199-206.

- Suwanto, A., H. Friska, and I. Sudirman. 1996. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* B 29 and profile, hypersensitivity test, and assay of bioactive compound. **Indonesia Phytopathology ABstracts**. 31(1): 15-20.
- Thomas Heinze , and Katy Pfeiffer. 1999. Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 266:37-45.
- Tiedink, H.G.M, C.E. Malingré, L.W. Broekhoven, W.M.F. Jongen, J. Lewis, and G.R. Fenwick. 1991. Role of glucosinolates in the formation of *N*-Nitroso compounds. **J. Agric. Food Chem.** 39: 922-926.
- Valverde, A., T. Hubert, A. Stolov, A. Dagar, J. Kopelowitz and S. Burdman. 2007. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. **Plant disease**. 56: 17-25.
- Van, L.L.C. and K.A. Van. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf protein from *Nicotiana tabacum* var. Samsum and Samsun NN II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **J. Virology** 40:199-211.
- Van, L.L.C and E.A. Van Strain. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.** 55: 85-97.
- Vattanatangum A. 1988. Resent problems on insecticide resistance of diamondback moth in Thailand. **In Annual Research Report for Entomology and Zoology Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.** pp. 645-658.
- Welker, N.E, and L.L Cambell. 1963. Effect of carbon sources on formation of amylase by *Bacillus Stearothermophilus*. **J. Bacteriol.** 86: 681-686.

Weger, L. A., C. I. M. van der Vlugt, A. H. M. Wijnjes, P. A. H. M. Bakker, B. Schippers, and B. Lugtenberg. 1987. Flagella of a plant-growthstimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. **J. Bacteriol.** 169:2769–2773.





ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient Glucose Broth (NGB)

Beef extract	3 กรัม
Bacto peptone	5 กรัม
Glucose	2.5 กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2 Nutrient Glucose Agar (NGA)

nutrient glucose broth	
วุ้น	15 กรัม

เตรียมโดยแบ่ง NGB ครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น วุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำวุ้นนำไปหลอมจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.3 King's B medium (KB)

Protease peptone #3	20 กรัม
K_2HPO_4	1.5 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 กรัม
วุ้น	15 กรัม
Glycerol	15 กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีการเตรียม NGA

1.4 Molass Soybean medium (MS medium)

Molass	5 กรัม
Soybean	10 กรัม
วุ้น	3 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

2.1 Motility Test Medium

Bacto-tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Agar	5 กรัม

เตรียมอาหารดังกล่าวในปริมาตรน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหารประมาณ 6.8 – 7 เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการ stab เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญออกนอกบริเวณปลูกเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

2.2 Starch Agar (Starch hydrolysis)

Bacto-tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Soluble starch	10 กรัม
Agar	13 กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อย

แบ่งได้โดยการหยคน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณสีขาวรอบ ๆ รอยขีดแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

2.3 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ Catalase

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหารเลี้ยง NGA ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดเชื้อ ถ้าภายในหลอดเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้

เอนไซม์ catalase มีบทบาทในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียให้เป็นออกซิเจนและน้ำได้ดังสมการ



2.4 สูตรอาหารสำหรับทดสอบ Oxygen Relationship

เตรียมอาหาร NGA ใส่ลงในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นโดยไม่ต้องเอียง นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้อายุ 24 ชั่วโมงมา stab ลงบนอาหารดังกล่าว สังเกตการเจริญและตำแหน่งการเจริญของเชื้อในอาหาร

2.5 Simmon's Citrate Agar (Citrate utilization)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 กรัม
$(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$	1 กรัม
$\text{K}_2 \cdot \text{HPO}_4$	1 กรัม
Sodium citrate	2 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	13 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารที่เตรียม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร (bromthymol blue) ทุกวัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้

2.6 Hydrolysis of Gelatin (gelatin hydrolysis)

Beef extract	10 กรัม
Bacto-Peptone	5 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Gelatin	12 กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ gelatinase ย่อย gelatin เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาพอุณหภูมิห้องย้ายหลอดเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส สังเกตการแข็งตัวของเจลาคติน ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้ อาหารที่ทดสอบจะไม่แข็งตัว

2.7 Christensen's Urea medium (Urease test)

Bacto-Peptone	1 กรัม
Glucose	1 กรัม
KH_2PO_4	2 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenal red 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15

ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็น ปล่อยให้อาหารเย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย Urea เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร เตรียมเป็น slant (acetic technique)

นำเชื้อเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง steak ลงบนอาหารเอียงที่เตรียม บ่มเชื้อไว้ประมาณ 5-7 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

2.8 Tryptone yeast extract broth (Indole test)

Bacto-trytone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม

เตรียมสารละลายดังกล่าวในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ย้ายเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร Tryptone yeast extract broth ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน เติมสารละลายทดสอบ (Kovac's reagent) 0.5 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ดูการเกิดสีเปรียบเทียบกับ control

Levan formation

เตรียมอาหาร NA (nutrient agar) ตามวิธีการข้างต้น เติมน้ำตาล sucrose ลงไปในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ นาน่งฆ่าเชื้อ เทลงใส่จานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการ cross streak เชื้อแบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ถ้ามีลักษณะนุ่มคล้ายโคมหรือเฝือกมากกว่าปกติ (control) แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (positive)

2.9 Nitrate broth (Nitrate reduction)

Beef extract	3 กรัม
Bacto-peptone	5 กรัม
KNO ₃	1 กรัม

เตรียมอาหารในอัตราส่วน 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อ ทำการทดสอบโดยการย้ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 2-5 วัน หยดสารทดสอบ (α - naphthylamine 0.5 เปอร์เซ็นต์ และหยด sulphanic acid 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 N acetic acid อัตราส่วน 1:1) ประมาณ 10 หยด สังเกตการณ์เกิดสีแดง แสดงว่าเชื้อสามารถ reduce nitrate ไปเป็น nitrite หรือ nitrogen ได้

2.10 Salt tolerance medium test

เตรียมอาหาร NB ตามวิธีการข้างต้น ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (5 และ 7 เปอร์เซ็นต์) แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

3.1 Gram's crystal violet

สารละลาย ก.

Crystal violet	2 กรัม
95 % Ethanol	20 มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

Ammonium oxalate	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย ก. และ ข. (Crystal violet ใน 95 % Ethanol 20 มิลลิลิตร และ สารละลาย 1% ammonium oxalate ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร) ผสมสารทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

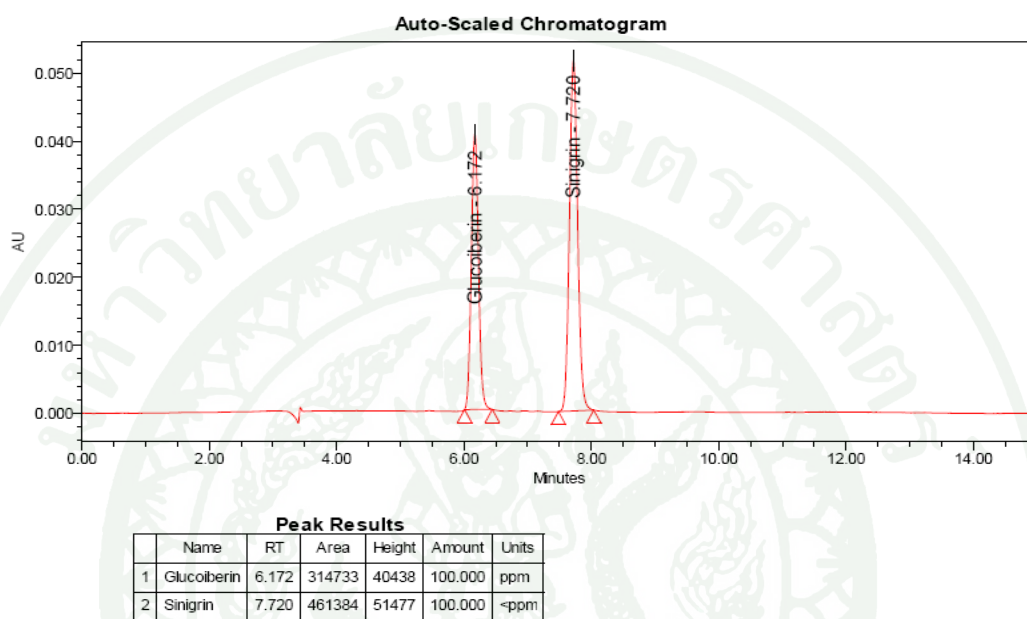
3.2 Safranin solution

Safranin	2.5 กรัม
95 % Ethanol	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

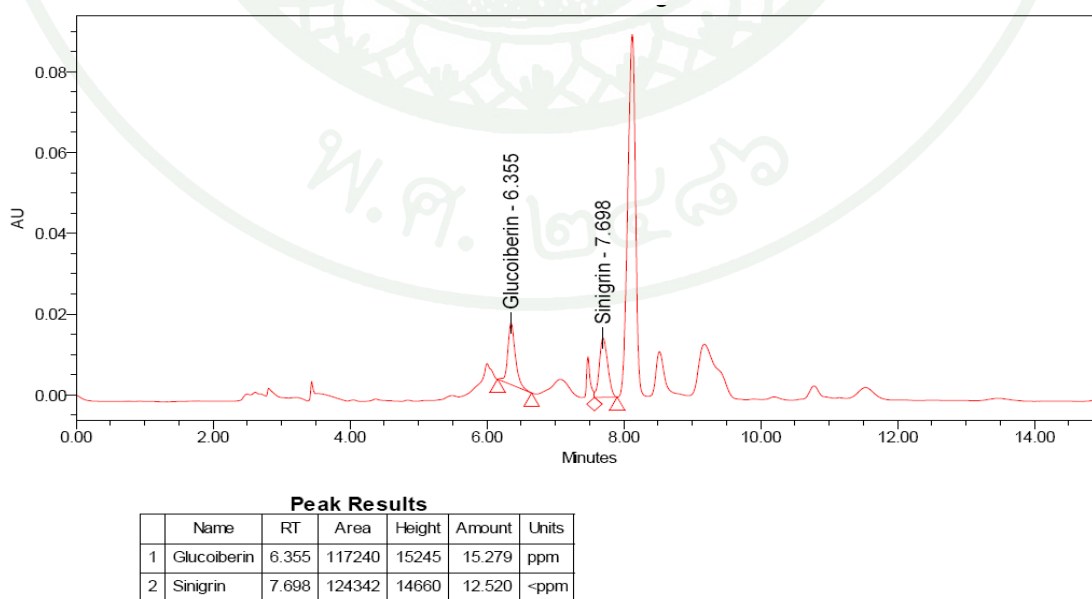
ละลาย Safranin ใน 95 % Ethanol แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่า

เชื้อ

ตารางภาคผนวก



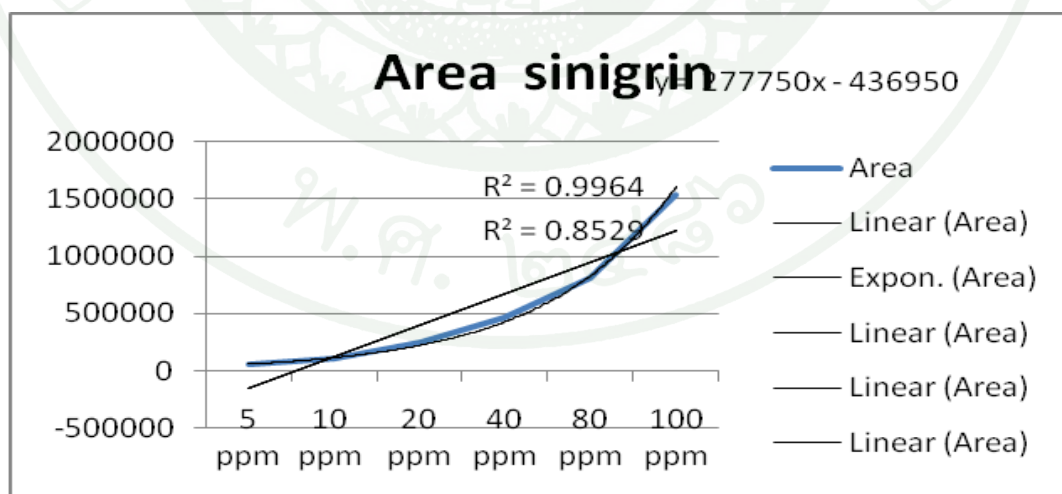
ภาพผนวกที่ 1 โครมาโตแกรมของสาร glucosinolate



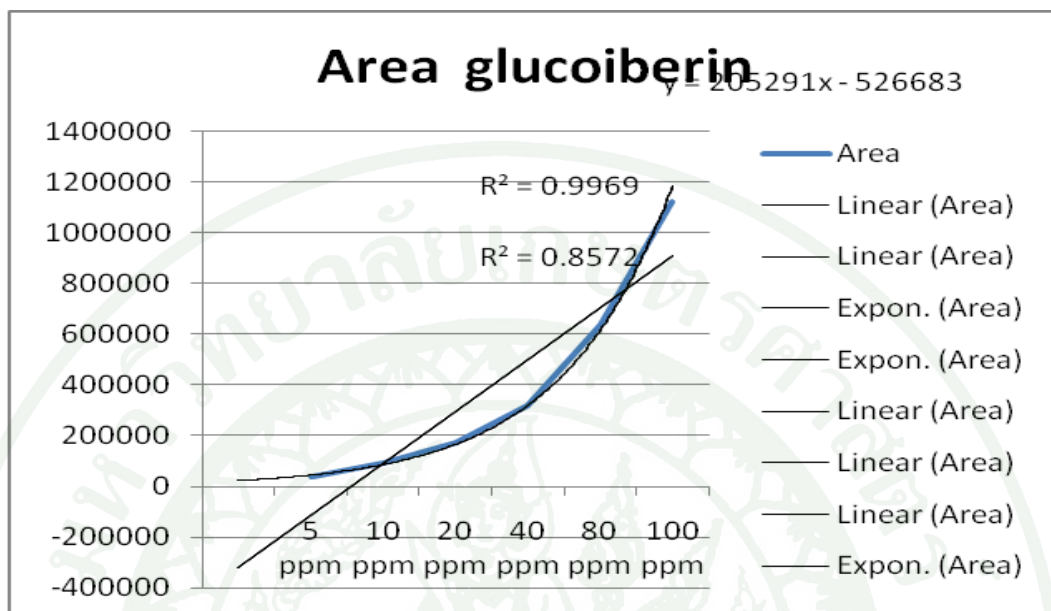
ภาพผนวกที่ 2 โครมาโตแกรมการฉีดตัวอย่างกะน้ำที่มีสาร glucosinolate

Condition ในการแยกสาร glucosinolate ด้วยเครื่อง HPLC

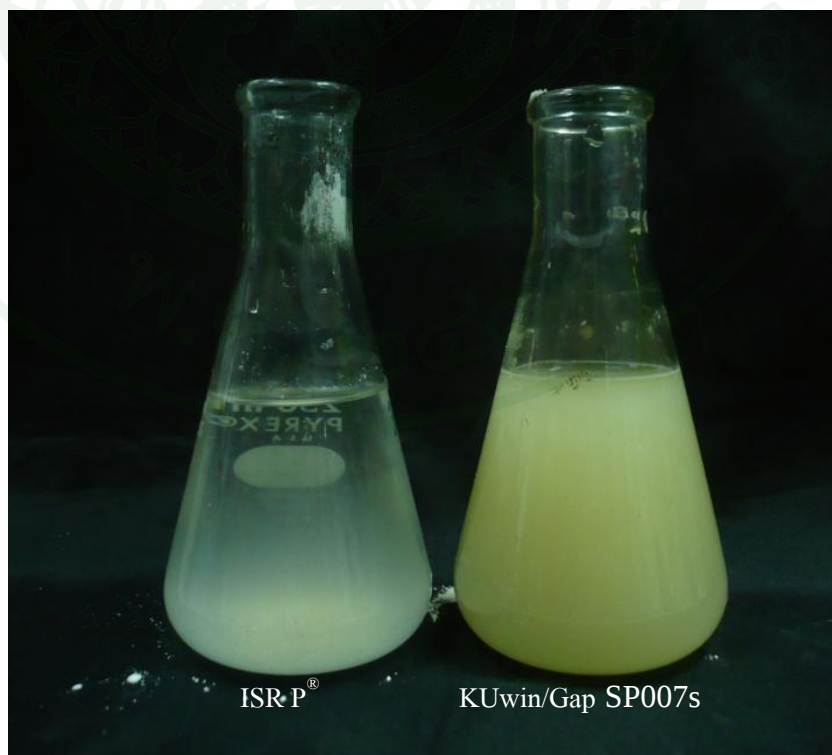
Column: P.No. :00G-4252-E0
 Desc. : Luma 5 μ C 18 (2) 100A
 Serial No :516572-31
 Size : 250x4.6 mm
 Batch :5291-80
 Mobile phase: acetonitrile 100% :Distill water (20:80)
 Flow rate: 1.0 ml/min for 15 min
 Stop time: 15 min
 Column temperature: 35°C
 Sample volume: 100 μ l was injected concentration 100 mg/ml
 Visible absorbance: 229-230 nm UV detector



ภาพผนวกที่ 3 กราฟและสมการ standard curve ของสาร sinigrin



ภาพผนวกที่ 4 กราฟและสมการ standard curve ของสาร glucoiberin



ภาพผนวกที่ 5 ผลิตภัณฑ์ KUwin/Gap SP007s และ ISR P[®] ผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพผนวกที่ 6 อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณที่เตรียมไว้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
P. fluorescens SP007s ตามรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวนลินา นามสกุล เหมสนิต
(ภาษาอังกฤษ) Miss Nalina Hemsanit
เกิดวันที่ 5 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด บ้านเลขที่ 64/3 ต. เขารูปช้าง อ. เมือง จ. สงขลา 90000
หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถนนงาม
วงศ์วาน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ : 084 1947383
โทรสาร : 0 25799550
E-mail: nalina_usa@hotmail.com
ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ปริญญา วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
จาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2550
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชาการ Biological control และ Integrated pest
management
ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภายใต้
การเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม โดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
งานวิจัย
นลินา เหมสนิต และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. *Pseudomonas fluorescens* SP007s กระตุ้นให้คะแน
สร้าง salicylic acid เพื่อต้านทานการเกิดโรคขอบใบทอง. ใน เอกสารประกอบการ
ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. 14 -17 มีนาคม 2552.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 611-620.
นลินา เหมสนิต วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. สาร glucosinolate จากน้ำคั้นพืชที่
Pseudomonas fluorescens SP007s ชักนำให้คะแนสะสมเพิ่มขึ้น มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการ
ติดเชื้อ เนื่องจาก *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขา
พืช ครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552 อุบลราชธานี. หน้า 465-474.

Athinuwat, D., N. Hemsanit and S. Prathuangwong. 2009. Detection of *Acidovorax avenae* subsp.

avenae in commercial corn seeds by semiselectd medium and BIO-PCR analysis and its correlation with seedling transmission. *In of Proc. the 1st International Conference on Corn and Sorghum Research*. April 8-10, 2009. Thailand. 41.

Hemsanit, N., S. Kasem, J. Thowthampitak and S. Prathuangwong. 2010. Application of New Microbial Formulation for Increased Glucosinolate Content Against Heavy Rain and Diseases of Kale Crop. *In Proc. of the ISSAAS International Congress*. Nov.14-18, 2010.Bali

Prathuangwong, S., W. Chuaboon., **N. Hemsanit** and W. pupakdeepan. 2010. Improved Rice Resistance to Disease and Drought Stress after Treatment with New Microbial Product Affects Antioxidant Regulation. *In Proc. of the ISSAAS International Congress*. Nov.14-18, 2010.Bali.

ประสบการณ์ในการทำงาน

- นิสิตปริญญาโทช่วยสอนรายวิชา 008469 โรคของพืชเศรษฐกิจ ภาคปลาย ปี 2551
- นิสิตปริญญาโทช่วยสอนรายวิชารายวิชา 01008473 การจัดการโรคพืชในโรงเรือน (Plant Disease Management in Nursery) ภาคต้น ปีการศึกษา 2553
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการ Academic Frontier Research Project, Japan; Commission on Higher Education, and Kasetsart University Research and Development Institute, Thailand. (2009)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาโรคของข้าวโพดและข้าวฟ่างในประเทศไทย ได้รับบุดหนุนจากสำนักวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2551-2552)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การจัดการโรคและแมลงเพื่อผลิตถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสดอย่างปลอดภัย ได้รับบุดหนุนจากสำนักวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2551)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์และสารสกัดพืช เพื่อควบคุมโรคและแมลง และ เพิ่มผลผลิตคุณภาพของพืชผัก ได้รับบุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2553)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยคอกผสมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในชุมชน ได้รับบุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2553)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการบริการวิชาการและถ่ายทอดเทคโนโลยีทางด้านเกษตร เรื่อง การใช้ปุ๋ยคอกผสมจุลินทรีย์เพื่อการผลิตข้าวอย่างปลอดภัย (2553)