ประเมินการใช้แบคทีเรียและราเอนโดไฟท์สำหรับควบคุมโรคเชื้อราบางชนิดของพริกโดยชีววิธี

Evaluation of Bacterial and Fungal Endophytes for Biological Control of Some Chili Fungal Diseases

ยุพาภรณ์ เดชโสภา

Yupaporn Detsopa

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partail Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประเมินการใช้แบคทีเรียและราเอนโดไฟท์สำหรับควบคุมโรค
เชื้อราบางชนิดของพริกโดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวยุพาภรณ์ เดชโสภา

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…….
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วาริน อินทนา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

……...
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ประเมินการใช้แบคทีเรียและราเอนโดไฟท์สำหรับควบคุมโรคเชื้อราบางชนิดของพริกโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางสาวยุพาภรณ์ เดชโสภา
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์เพื่อนำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพริก ซึ่งได้แก่โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 146 ไอโซเลท จากเนื้อเยื่อปกติของพริกจากตัวอย่างใบ กิ่ง และราก และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 205 ไอโซเลท โดยการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อปกติของพริกจากตัวอย่างใบ ก้านใบ กิ่ง และราก ด้วยวิธี tissue transplanting และ dilution spread plate ตามลำดับ นำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นเอนโดไฟท์แยกได้จากเนื้อเยื่อพริกปกติ (isolates End1-6) มาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเป็นโรค (isolates Path1-6) บนผลพริก เมล็ดพริกและต้นกล้าพริก พบว่า เชื้อ *Colletotrichum* End1-6 และ *Colletotrichum* Path1-6 สามารถทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบ ซึ่งเชื้อ *Colletotrichum* End1-6 ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงน้อยกว่า *Colletotrichum* Path1-6 สังเกตเห็นได้ชัดบนผลพริกสีเขียว ยกเว้นการทดสอบบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าที่เชื้อ *Colletotrichum* End1-6 ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงกว่า *Colletotrichum* Path1-6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C1, *Colletotrichum gloeosporioides* C5, *Cercospora capsici* Ce7 และ *Sclerotium rolfsii* S5 โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* S5 ได้โดยการแย่งพื้นที่ แต่เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ไม่สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ และเชื้อราเอนโดไฟท์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงไม่นำเชื้อเหล่านี้ไปศึกษาในขั้นต่อไป ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคของพริกทั้ง 4 ชนิดได้ ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* BPNab1.1, *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ได้ดีที่สุด เมื่อนำมาทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อ พบว่า เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 สามารถเจริญร่วมกันได้ ประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดย

วิธี standard blotter plate พบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้า ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรค เท่ากับ 35.98 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BPNab1.1, *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 เพียงอย่างเดียว การทดลองในสภาพแปลงทดลอง กรรมวิธีที่ใช้ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราโดยมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรค 74.48 และ 28.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของต้นพริกชี้ฟ้าโดยมีต้นพริกชี้ฟ้าที่อยู่รอด 85.00 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้า และยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสและโรครากและโคนเน่าของต้นพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลองได้

Thesis Title	Evaluation of Bacterial and Fungal Endophytes for Biological Control of Some Chili Fungal Diseases
Author	Miss Yupaporn Detsopa
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2010

ABSTRACT

The objective of this study was to screen bacterial and fungal endophytes for control fungal diseases of chili such as anthracnose, Cercospora leaf spot and root and foot rot.

A total of 146 isolates of fungal endophytes were isolated from healthy leaves, branches and root and 205 isolates of bacterial endophyte were isolated from healthy leaves, petiole, branches and root by tissue transplanting method and dilution spread plate, respectively. Six isolates of endophytic *Colletotrichum* spp. (End1-6, isolated from healthy tissue) and six isolates of pathogenic *Colletotrichum* spp. (Path1-6, isolated from disease tissue) were inoculated on fruits, seeds and seedlings of chili pepper to compare the virulence of each isolate. The results showed that End1-6 and Path1-6 were able to produce disease symptom on the tested plants. Except on chili pepper seeds, End1-6 showed less virulence than path1-6 and obviously observed on green fruits. All isolates of bacterial and fungal endophytes were tested *in vitro* for their inhibitory effect on the mycelial growth of *Colletotrichum capsici* C1, *Colletotrichum gloeosporioides* C5, *Cercospora capsici* Ce7 and *Sclerotium rolfsii* S5 by dual culture plates. All of the fungal endophytes slightly inhibited the growth of *S. rolfsii*. Therefore, fungal endophytes wasn't used in the next study. Bacterial endophytes were antagonistic to all of the tested fungi. Three effective bacterial isolates in inhibiting chili fungal pathogens were selected and further identified as *Bacillus subtilis* BPNab1.1, *B. subtilis* BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5. The compatibility of each isolate were tested on Muller Hinton agar (MHA) plates. The result showed that *B. subtilis* BKSol1.3 can grow together with *B. subtilis* BMSul1.5. All three isolates of *B. subtilis* were applied for controlling anthracnose disease on chili pepper seeds in standard blotter plates. A mixture of *B. subtilis* BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5 effectively reduce the severity of anthracnose on seeds by 35.98% which were significantly as compare to *B. subtilis* BPNab1.1,

B. subtilis BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5. At field plot experiment, the results showed that a mixture of *B. subtilis* BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5 could reduce anthracnose and Cercospora leaf spot by 74.48% and 28.57%, respectively. For root and foot rot disease, the highest percentage of survival in chili pepper plants was 85.00% at the end of the experiment in the mixture of *B. subtilis* BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5 treatment. The experiment can be summarized that a mixture of *B. subtilis* BKSol1.3 and *B. subtilis* BMSul1.5 effectively reduced the severity of anthracnose on seeds and effectively reduce anthracnose and root and foot rot of chili under field condition.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันณ์ เพชรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วาริน อินทนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจำลอง ชูกำเนิด คุณสุภาพ จันทรัตน์ คุณปัทมาพร อินสุวรรณโณ และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเอื้ออำนวยความสะดวก ทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์และความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความห่วงใยและเป็นกำลังใจที่สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้กันตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ยุพาภรณ์ เดชโสภา

สารบัญ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(11)
รายการภาพ	(12)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	29
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	30
วัสดุและอุปกรณ์	30
วิธีการทดลอง	32
3. ผลและวิจารณ์การทดลอง	49
4. สรุปผลการทดลอง	104
เอกสารอ้างอิง	109
ภาคผนวก	122
ประวัติผู้เขียน	133

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ	6
2. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ	22
3. สถานที่เก็บตัวอย่างพริกและจำนวนตัวอย่าง	50
4. ค่า Isolate prevalence ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นพริก	52
5. จำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบ กิ่งและรากของต้นพริก	53
6. จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบ ก้านใบ กิ่งและรากของต้นพริก	54
7. อัตราการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นเวลา 7 วัน	65
8. ความรุนแรงของโรคบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นเวลา 9 วัน	68
9. ความรุนแรงของโรคบนต้นพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 เป็นเวลา 7 วัน และจำนวนของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่ re-isolation จากเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นโรคของพืชที่ปลูกเชื้อ	72
10. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 โดยเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก ใบพริก และกิ่งต้นพริก	76
11. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 *Colletotrichum capsici* C1 *Colletotrichum gloeosporioides* C5 และ *Cercospora capsici* Ce7 โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบ ก้านใบ กิ่ง และรากของต้นพริก	83
12. เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นพริก	89
13. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการลดการเข้าทำลายเมล็ดพริกชี้ฟ้าโดยเชื้อ *Colletotrichum capcisi* เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม	97

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง	101
15. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุม การเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง	103

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. การเตรียม Mc Farland Standard เบอร์ต่างๆ	128
2. วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกแก่สีเขียว	129
3. วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกสุกสีแดง	129
4. วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ย acervuli บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า	129
5. วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริกชี้ฟ้า	130
6. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนส	130
7. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า	130
8. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า	131
9. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา)	131
10. วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุมการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง (เปอร์เซ็นต์ต้นตาย)	131
11. วิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่า)	132

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยวิธี dual culture	39
2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture	41
3. เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส	56
4. เชื้อรา *Cercospora capsici* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา	58
5. เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า	60
6. การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้า	62
7. ลักษณะอาการของโรครากและโคนเน่าที่ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* S5 เพื่อพิสูจน์โรคบนต้นพริกชี้ฟ้า	63
8. อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	66
9. ความรุนแรงของรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อปกติและเป็นโรคของพริกบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า	69
10. ลักษณะอาการแผลบนใบพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 7 วัน	73
11. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum* spp. จากการ re-isolate เชื้อ หลังการปลูกเชื้อบนต้นพริกชี้ฟ้า	74
12. ลักษณะของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5	79
13. การยับยั้งของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 และเชื้อราเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 4 วัน	80
14. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 หลังการทดสอบ 4 วัน	81
15. การยับยั้งของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 4 วัน	85
16. การยับยั้งของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C1 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 12 วัน	86

รายการภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17. การยับยั้งของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* C5 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 12 วัน	87
18. การยับยั้งของเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce7 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 45 วัน	88
19. เชื้อราเอนโดไฟท์	90
20. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ บนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง	92
21. ลักษณะรูปร่าง การติดสีของเซลล์แบคทีเรียและลักษณะรูปร่างของเอนโดสปอร์	93
22. ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร MHA	95
23. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้า หลังการทดสอบ 11 วัน	98

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถปลูกได้เกือบทั่วโลก ในประเทศไทย พริกถือเป็นพืชที่ประชาชนนิยมบริโภคมาก และยังเป็นพืชที่ส่งออกขายต่างประเทศที่สำคัญชนิดหนึ่ง สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท โดยส่งออกในรูปของพริกแห้งและพริกสด (มณีฉัตร นิกรพันธุ์, 2541)

ในการปลูกพริกมักมีปัญหาโรคเข้าทำลายทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหาย ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ คิดเป็นเงินที่ต้องสูญเสียไปมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี ซึ่งโรคที่สำคัญของพริก เช่น โรคใบจุด (leaf spot) โรคเน่าคอดิน (damping-off) โรคเหี่ยว (wilt) โรคราแป้ง (powdery mildew) โรครากและโคนเน่า (root and foot rot) และโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เป็นต้น โดยเมื่อเกิดโรคกับต้นพริกส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ต้องคัดผลทิ้งหรือขายผลผลิตที่ได้ในราคาที่ต่ำ ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณที่ต่ำลง

การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ โดยทั่วไปเกษตรกรมักใช้สารเคมีกำจัดเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างได้ผล แต่การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดนั้นมักก่อให้เกิดปัญหาตามมา เช่น เป็นอันตรายโดยตรงต่อเกษตรกรผู้ใช้ อันตรายจากสารตกค้างในผลผลิตต่อผู้บริโภค ทำลายระบบนิเวศ และก่อให้เกิดการต้านทานของเชื้อโรค เป็นต้น ปัจจุบันจึงมีผู้หันมาสนใจศึกษาการควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control) เพื่อแก้ไขหรือลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืช (เกษม สร้อยทอง, 2551; ศิริรัตน์ ใจแล, 2546 ; Jeyalakshmi *et al*., 1998 อ้างโดย เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง, 2547) การใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาและได้นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี อันเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์เอื้อประโยชน์ให้แก่พืชอาศัยโดยจะป้องกันพืชอาศัยจากการเข้าทำลายของศัตรู กระตุ้นให้พืชเกิดปฏิกิริยาป้องกันตัวเอง และพบว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive agents) เช่น สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัสและสารป้องกันกำจัดแมลง เป็นต้น ช่วยในการเจริญของพืชและมีอิทธิพลต่อบทบาทการแก่งแย่งแข่งขันกับพืชชนิดอื่น (Lu *et al.,* 2000)

ตรวจเอกสาร

โรคที่สำคัญของพริก

ในการผลิตพริกมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงเข้าทำลาย ทำให้ต้นพริกและผลพริกได้รับความเสียหายทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ซึ่งสาเหตุโรคมีทั้งที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น การขาดธาตุอาหาร และเกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย เช่น โรคเน่าเละจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al*. โรคแผลจุดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Jones *et al*.) โรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. โรคเหี่ยวหรือโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* Schlecht. ex Fr. โรคใบด่างจากเชื้อไวรัส และโรครากปมจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chit (ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2549) แต่โรคที่ถือว่าเป็นโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรผู้ปลูกพริกมากที่สุด คือ โรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โรครากและโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. และโรคที่พบได้ทั่วไปในการปลูกพริกอีกโรคคือ โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora capsici* Heald & Wolf (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

1. โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose)

เชื้อสาเหตุและอาการของโรค

โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. หลายชนิด Hadden และ Black (1987) รายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. 4 ชนิด คือ *C. capsici* (Syd.) Butler & Bisby, *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds และ *C. coccodes* (Wallr.) Hughes ในประเทศไทยพบว่าเกิดจากเชื้อ *Colletotrichu*m spp. 3 ชนิด คือ *C. capsici*, *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* (ปวีณา มนตรี และคณะ, 2551)

โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดและทำความเสียหายเฉพาะผลพริก แต่ในกรณีที่โรคระบาดรุนแรงสิ่งแวดล้อมเหมาะสมอาจเกิดอาการมีแผลขึ้นที่ต้น กิ่ง ใบ ได้เช่นกัน ที่ผลพริกอาการเริ่มจากแผลหรือจุดช้ำเป็นแอ่งยุบลง ลักษณะอาจกลมหรือไม่แน่นอน ขนาดแผลมีขนาดตั้งแต่จุดเล็กไปจนโตเต็มความกว้างของผลพริก อาจมีเพียงแผลเดียวหรือหลายแผลก็ได้ ต่อมาแผลเหล่านี้จะแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำพร้อมกับสร้าง fruiting body ซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์หรือโคนิเดีย เป็นจุดสีเหลืองส้มหรือน้ำตาลดำเป็นวงๆ เรียงซ้อนกันอยู่ที่แผล เชื้อเข้า

ทำลาย ผลพริกได้ทุกระยะการเจริญตั้งแต่เริ่มเป็นผลเล็กๆ จนโตเต็มที่และสุกแดงแล้ว (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537)

การป้องกันกำจัด

อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2546) แนะนำว่าการปลูกพืชที่ให้ผลในฤดูฝน ควรพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น ไซแนบ มาเนบ เบนโนมิล เป็นต้น เมื่อเริ่มปรากฏการระบาดของโรค ให้ฉีดพ่นทุก 5-7 วันต่อครั้ง ในกรณีที่ผลพริกป็นโรคให้เก็บส่วนที่เป็นโรคไปฝังหรือเผาทำลายให้มากที่สุด และไม่ใช้เมล็ดพันธุ์ที่เก็บมาจากแหล่งหรือไร่ที่เป็นโรคมากๆ มาทำพันธุ์ ในแปลงปลูกควรปลูกพืชอื่นๆ สลับหมุนเวียนบ้าง ปรับปรุงดินเพื่อป้องกันโรคโดยการใส่ปูนขาวและปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งให้ใส่ปูนขาว 200-300 กิโลกรัม และปุ๋ยอินทรีย์ 2-4 ตันต่อไร่ จะทำให้พริกมีความต้านทานต่อโรคนี้

2. โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา (Cercospora leaf spot)

เชื้อสาเหตุและอาการของโรค

โรคใบจุดเซอร์คอสปอราเกิดจากเชื้อรา *Cercospora capsici* เป็นโรคที่พบได้โดยทั่วไปในทุกแห่งที่มีการปลูก มักพบในใบแก่เพียง 2-3 ใบ ที่อยู่ตอนล่างๆ ของต้น ไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย แต่ในบางท้องถิ่นที่มีสิ่งแวดล้อมเหมาะสมเอื้ออำนวยต่อเชื้อ ก็จะกลายเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงได้

อาการที่ปรากฏของโรคนี้ที่ใบ ลำต้น และก้านผล มีแผลวงกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อตรงกลางแผลแห้งบางเป็นสีขาวหรือสีเทา กลางแผลมีราสีเทาดำขึ้นเป็นกระจุก แผลขยายใหญ่รวมกันเป็นแผลใหญ่ เนื้อเยื่อรอบแผลมีสีเหลือง ทำให้ใบเหลืองทั้งใบร่วงหล่นง่าย ถ้ามีแผลที่ขั้วผลจะทำให้ผลร่วง (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

การป้องกันกำจัด

เลือกใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค งดหรือหลีกเลี่ยงการปลูกพริกในแปลงหรือดินปลูกที่เคยมีโรคระบาดมาก่อนอย่างน้อย 2 ปี เมื่อเกิดโรคให้ฉีดพ่นต้นพริกด้วยสารเคมี เช่น บอร์โดมิกซ์เจอร์ 6:6:100 ไซเนบ ไซแรม หรือมาเนบ ในอัตราความเข้มข้น 40-60 กรัมต่อน้ำ 1 ปี๊บ ทุกๆ 5-7 วัน (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) ก่อนปลูกควรใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปูนขาวเพื่อปรับปรุงดิน จะช่วยให้โรคลดน้อยลง และควรเพิ่มปุ๋ยอินทรีย์เมื่อพริกออกผลแล้ว 1-2 ครั้ง (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

3. โรครากและโคนเน่า (Root and foot rot)

เชื้อสาเหตุและอาการของโรค

โรครากและโคนเน่าเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* อาการที่ปรากฏของโรคที่บริเวณโคนต้นและรากเน่าเป็นสีน้ำตาล บริเวณรอบโคนต้นมีเส้นใยราสีขาว ซึ่งบางส่วนเจริญขึ้นไปเกาะอยู่ตามโคนและรากของต้นพริก ปรากฏเม็ดสเคลอโรเทียมสีขาว น้ำตาลอ่อนและสีน้ำตาลแก่ขนาดเท่าเมล็ดผักกาด เกิดปะปนอยู่กับเส้นใยรา ต้นที่เป็นโรคแสดงอาการใบเหลือง ต่อมาต้นจะเหี่ยวตาย (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

การป้องกันกำจัด

เมื่อพบต้นที่เป็นโรค ให้ขุดเอาดินและต้นที่เป็นโรคไปเผาทำลาย ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในดิน เช่น ยาเทอราคลอ ผสมน้ำรดในหลุมที่เป็นโรค ใช้ปูนขาวคลุกดินในหลุมก่อนปลูกพืชใหม่ หากโรคระบาดมากต้องเลิกปลูกไปเป็นเวลาหลายปี หรือปลูกพืชสลับหมุนเวียนอย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 5 ปี และยังป้องกันโรคได้ด้วยการปรับปรุงดินปลูกใหม่ด้วยปูนขาวและอินทรียวัตถุ การใส่ปูนขาว 200-300 กิโลกรัม และปุ๋ยอินทรีย์ประมาณ 2-4 ตันต่อไร่ เชื้อโรคนี้จะชะงักไป หรือโรคลดน้อยลงได้มาก (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546)

เอนโดไฟท์

เอนโดไฟท์ คือ สิ่งมีชีวิตที่ในช่วงหนึ่งหรือตลอดวงจรชีวิต สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้ (Azevedo *et al*., 2000) อาจเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย แอคทิโนมัยซิส เชื้อรา และปรสิตของพืช ซึ่งสิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะพบอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีชีวิตของพืช สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืชอาศัย (Kirk *et al*., 2001) แต่เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจากความแห้งแล้งหรือขาดน้ำ ราเอนโดไฟท์อาจก่อให้เกิดอาการของโรคได้ (Carroll, 1988)

ราเอนโดไฟท์ คือ เชื้อราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างภายในเซลล์ของลำต้น ก้านใบ ราก และใบของพืชที่มีความสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆ กับพืชอาศัย โดยราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในทุกๆ ส่วนของพืช (Petrini and Petrini, 1985; Dix and Webster, 1995; Saikkonen *et al*., 1998) โดยพบว่าอยู่ในส่วนของใบ เปลือก ท่อน้ำ (Petrini, 1986) ก้านใบ ลำต้น ราก และเมล็ด (Blodgett *et al*., 2000) ไม่พบในส่วนของตา (bud) แต่พบเมื่อเจริญเป็นใบ (Elamo *et al*., 1999) เนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟท์ ยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยราเอนโดไฟท์อาจมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยซึ่งอยู่ในภาวะเกื้อกูล (mutuality) หรืออิงอาศัย (symbiosis) (Redlin and Carris, 1985) หรือเป็นเชื้อก่อโรค (Petrini, 1991) เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟท์บางชนิดเป็น latent

pathogen ในพืชอาศัย Smith และคณะ (1996) รายงานว่าพบเชื้อ *Botryosphaeria dothidea* ในใบของยูคาลิปตัสที่ปกติในแอฟริกาใต้ ซึ่งโดยปกติเชื้อ *B. dothidea* เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญในต้นไม้เนื้อแข็งรวมถึงยูคาลิปตัสด้วย ในปัจจุบันพบว่าราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญทางด้านการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม (Azevedo *et al*., 2000; Huang *et al*., 2001; Strobel, 2002; Strobel and Daisy, 2003; Ma *et al*., 2004) เชื้อราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่อยู่ใน Class Ascomycetes และ Deuteromycetes พบน้อยใน Basidiomycetes และพบจำนวนน้อยมากใน Oomycetes (Isaac, 1992)

พืชทุกชนิดสามารถแยกและพบเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ทั่วไปในพืช โดยพืชแต่ละชนิดพบเชื้อราเอนโดไฟท์อย่างน้อย 1 ชนิด หรือมากกว่า ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืช เช่น เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกล้วยไม้คนละสายพันธุ์จะพบเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกัน (เลขา มาโนช และคณะ, 2544) พืชสกุลหญ้าสามารถแยกได้เชื้อราเอนโดไฟท์ที่หลากหลาย โดยพบ *Xylaria* sp. สูงสุด รองลงมา คือ *Colletotrichum* sp. และ *Eupenicillium* sp. (ศิริรัตน์ ใจแล, 2546) ส่วนในพืชสมุนไพรสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้หลายสายพันธุ์เช่นกัน ราที่พบมากได้แก่ *Colletotrichum* sp. รองลงมาได้แก่ *Pestalotiopsis* sp., *Phyllosticta* sp. และ *Phomopsis* sp. (จิตรา เกาะแก้ว และคณะ, 2550) จึงเห็นได้ว่าเชื้อราบางสายพันธุ์เป็นเอนโดไฟท์ของพืชหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
1. กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) - *Eria albidotomentosa* (Bl.) Lindl. - *Lusidia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich (ว่านน้ำทอง) - *Spathoglottis plicata* Bl. (เอื้องดินใบหมาก)	 *Colletotrichum* sp. *Nodulosporium* sp. Xylariaceae	เลขา มาโนช และคณะ (2544)
2. พืชสกุลหญ้า - หญ้าแห้วหมู (nutgrass: *Cyperus rotundus*) - หญ้าคา (cogongrass: *Imperata cylindrica*) - หญ้าแขม (common reed: *Phragmites vallataria*)	*Aspergillus* sp., *Blastomyces* sp., *Cercospora* sp., *Cladosporium* sp., *Codinaea* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Emericella* sp., *Eupenicillium* sp., *Eurotium* sp., *Fusarium* sp., *Geniculosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Gilmaniella* sp., *Helicorhoidion* sp., *Massariothea* sp., *Monodictys* sp., *Neosartorya* sp., *Nigrospora* sp., *Nodulisporium* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Talaromyces* sp., *Torula* sp., *Virgaria* sp. และ *Xylaria* sp. - เชื้อราที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ ได้แก่ Hyphomycetes ไอโซเลท 1-10,	ศิริรัตน์ ใจแล (2546)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
	Coelomycetes ไอโซเลท 1-6, Mycelia Sterilia ไอโซเลท 1-31, Ascomycetes ไอโซเลท 1-3 และ Unknown ไอโซเลท 1-9	
3. ต้นช้าพลูและคาวตอง	- จำแนก genus ได้ 8 กลุ่ม คือ *Chaetomium* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Corynespora* spp., *Curvularia* spp., *Sclerococcum* spp., *Phomopsis* spp. และ *Pestalotiopsis* spp. - จำแนก genus ไม่ได้ 11 กลุ่ม Ascomycetes (2), Coelomycetes (2) และ Mycelia Sterilia (7)	เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง (2547)
4. พืชสกุล *Garcinia* - ส้มแขก (*Garcinia atroviridis*) - มะพูด (*G. dulcis*) - มังคุด (*G. mangostana*) - ชะมวง (*G. nigrolineata*) - *G. scortechinii*	- จำแนก genus ได้ คือ *Botryosphaeria* sp., *Curvularia* sp., *Eutypella* sp., *Fusarium* sp., *Fusicoccum* sp., *Penicillium* sp., *Phomopis* sp. และ *Xylaria* sp. - จำแนกถึงระดับ species ได้ คือ *Aspergillus aculeatus* , *Guignardia mangiferae* และ *Penicillium paxilli* - จำแนกได้เพียงระดับ family คือ Xylariaceous fungi	ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย (2549)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
5. พืชสมุนไพร - มะกอกป่า (*Spondias* sp.) - ค้อนตีหมา (*Ancistroclaudus extensus*) - นาวน้ำ (*Artabotrys spinosus*) - โกศจุฬาลำพา (*Artemisia annua*) - ผักหวานใหญ่ (*Claoxylon indicum*) - ราชพฤกษ์ (*Cassia javanica*) - ฝางส้ม (*Caesalpinia sappan*) - โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum*) - ชะเอมเถา (*Myriopteron extensum*) - เตยหนาม (*Pandanus* sp.) - ตะขาบปีนกล้วย (*Muehlenbeckia platyclada*) - ทับทิม (*Punica granatum*) - ส้มกุ้ง (*Ampelocissus martini*)	- Class Hyphomycetes 25 สายพันธุ์ 7 สกุล(genera) ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Cylindrocladium* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium semitectum*, *Fusarium graminearum*, *Nigrospora oryzae* และ *Phaeotrichoconis* sp. - Class Coelomycetes แยกได้ 135 สายพันธุ์ 5 สกุล ได้แก่ *C. gloeosporioides* , *C. dematium*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis palustris*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp. และรา Coelomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิด 15 สายพันธุ์ - Class Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ *Xylaria* spp. รา Ascomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 5 สายพันธุ์ - ราที่ยังไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ (Mycelia Sterilia) จำนวน 55 สายพันธุ์	จิตรา เกาะแก้ว และคณะ (2550)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
- กระวาน, เร็ว (*Amomum* sp.) - กระชายขาว, ขิงป่า (*Globba* sp.)		
6. Oilseed rape (*Brassica napus*)	*Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Mortierella* spp., *Fusarium* spp. และ *Alternaria* spp.	Alstrom (2000)
7. กล้วย (*Musa acuminata*)	*C. gloeosporioides*, *C. musae*, *Guignardia cocoicola*, *Deightoniella torulosa*, *Pyriculariopsis parasitica*, *Dactylaria* sp., Xylariaceous spp. และ Mycelia Sterilia	Photita และคณะ (2001)
8. ทุเรียน (*Durio zibethinus*)	*Phomopsis* sp., *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Nigrospora* sp., *Phyllosticta* sp., *Curvularia* sp., สมาชิกของ Basidiomycetes และ Xylariaceae	Brown และคณะ (2002)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
9. ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	*Chaetomium* sp. และ *Phoma* sp.	Dingle และ McGee (2003)
10. ข้าว (*Oryza sativa* L.)	*Acremonium* sp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceous*, *Chaetomium globosum*, *Chlamydomyces palmarum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coniothyrium fuckelli*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola fuscoatra*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium decumbens*, *Phialophora verrucosa*, *Rhizoctonia solani*, *Speiropsis pedatospora*, *Stemphylium botryosum*, *Trichoderma viride* และ Sterile form	Naik และคณะ (2006)
11. ผัก - พริก (*Capsicum annuum* L.) -แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) -มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) -ฟักทอง (*Cucurbita pepo* L.)	*Fusarium* sp., *Chaetomium* sp., *Penicillium* sp., *Coniochaeta ligniaria, Colletotrichum* sp. และ *Talaromyces* sp.	Kim และคณะ (2007)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พืชที่แยกเชื้อ	ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
-ผักกาดขาวจีน (*Brassica campestris* var. *pekinensis* Makino)		
12. โกโก้ (*Theobroma cacao*)	*Acremonium* spp., *Arthrinium* spp., *Aspergillus* spp., *Asteromella* spp. *Clonostachys* spp., *Clonostachys rosea* var. *catenulatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coniothyrium* spp., *Curvularia* spp., *Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium viride*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Myrothecium verrucaria*, *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp. *Pestalotiopsis* spp., *Phoma* spp. *Septoria* spp., *Talaromyces* spp. *Tolypocladium* spp., *Trichoderma* spp. *Trichoderma asperellum* *T. martialeb*, *T. stromaticum* *T. virens*, *Verticillium* spp. และ Mycelia Sterilia	Hanada และคณะ (2010)

บทบาททางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับราเอนโดไฟท์ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และหน้าที่ของราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย และประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ทางชีวภาพ ซึ่งพบว่าราเอนโดไฟท์บางชนิดอาจจะก่อโรคได้ถ้าพืชอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม และบางชนิดทำหน้าที่สร้างสารพิษที่ปกป้องพืชจากสัตว์กินพืช ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มราเอนโดไฟท์ตามบทบาททางชีวภาพดังนี้ (ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย, 2549)

1. ผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติ (decomposer)

ราเอนโดไฟท์มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ตามธรรมชาติ เช่น ราเอนโดไฟท์กลุ่ม Xylariaceae ที่อาศัยอยู่ในพืช น่าจะมีบทบาทเพื่อรอที่จะย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินในซากพืชหลังจากที่พืชตาย (Petrini *et al*., 1995) Yuan และคณะ (2011) ศึกษาความสัมพันธ์ในระบบนิเวศวิทยาของราเอนโดไฟท์ในต้นสน พบว่า ราเอนโดไฟท์กลุ่ม ascomycetes และ basidiomycetes มี laccase gene ซึ่งทำให้ราในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย lignocellulose ได้ ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืชสามารถเข้ายึดครอง และเริ่มกระบวนการย่อยสลายได้ก่อนเชื้อกลุ่มแซปโปรไฟท์ (saprophyte) ที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Davis *et al*., 2003) และเมื่อราเอนโดไฟท์เริ่มกระบวนการย่อยสลายในพืชที่ตายแล้ว จะทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรแร่ธาตุและสารอาหาร

2. ราเอนโดไฟท์กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (endophytic fungi as plant promoting microbe)

การศึกษาบทบาทของราเอนโดไฟท์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น ราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* ซึ่งอาศัยอยู่ในรากของพืช มีผลในการเพิ่มน้ำหนักของรากและยอดของพืชหลายชนิด (Varma *et al*., 1999; Waller *et al*., 2005) Clay (1987) ได้ทำการศึกษาผลของเอนโดไฟท์ต่อ *Lolium perenne* และ *Festuca arundinacea* ในโรงเรือน พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถช่วยส่งเสริมอัตราการงอกของเมล็ดและส่งเสริมความแข็งแรงในต้นกล้า Muller (2003) ได้ทดลองปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Epichloe typhina* ในหญ้า *Lolium perenne* พบว่าทำให้พืชมีน้ำหนักน้อยลง แต่เมื่อปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิด *Neotyphodium lolii* มีผลทำให้พืชมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น Edathil และคณะ (1996) ทดลองปลูกเชื้อ vascular-arbuscular mycorrhiza (VAM) 4 ชนิดในเมล็ดมะเขือเทศ พบว่าเมื่อต้นกล้าเจริญ ยอดและน้ำหนักของต้นมะเขือเทศสูงกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ VAM และยังพบอีกว่าเชื้อ VAM สามารถเพิ่มความเข้มข้นของธาตุ N และ P ในต้นมะเขือเทศอีกด้วย การกระตุ้นการเจริญของพืช อาจเนื่องจากสารที่ได้จากราเอนโดไฟท์มีผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรค Amico และคณะ (2008) ทดลองปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก ผักกาดหอม

ผักชี ยี่หร่า และชิโครี่ พบว่าเชื้อ *Acremonium kiliense*, *Acremonium cucurbitacearum* และ *Plectosporium tabacinum* มีผลทำให้รากของผักเหล่านี้เจริญได้ดี

3. ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของเอนไซม์ (endophytic fungi as source of enzyme)

มีการศึกษาถึงความสามารถของราเอนโดไฟท์ ที่สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นพิกุล (*Mimusops elengi*) สามารถผลิตเอนไซม์ phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และราเอนโดไฟท์ชนิดนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์อื่นๆ ได้แก่ amylase, xylanase, endogluconase และ acid phosphatase (Sopalun, 2004) ราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* นอกจากจะสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase และ glucan-water dikinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้ง (Sherameti *et al*., 2005) ราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. สามารถหลั่งเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ amylase, cellulase, lipase, pectinase และ protease ในสภาวะ pH ที่แตกต่างกัน (Maccheroni *et al*., 2004) และราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้น *Drimys winteri* และ *Prumnopitys andina* พบว่าเชื้อรา *Bjerkandera* sp., เชื้อราในกลุ่ม deuteromycete *Mycelia sterilia* (Dw-2), เชื้อราในกลุ่ม basidiomycete (Pa-1) ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ และ *M. sterilia* (Pa-2) สามารถผลิตเอนไซม์ lignocellulolytic (Oses *et al*.,2006)

4. ราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช (endophytic fungi as plant protector)

บทบาทของราเอนโดไฟท์ที่ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช เป็นผลมาจากสารพิษจำพวก alkaloids ที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) ergot alkaloids 2) indolediterpenes 3) pyrrolopyrazine และ 4) saturated aminopyrrolizidines หรือ lolines โดยสาร alkaloids ทั้ง 4 กลุ่ม มีความเป็นพิษต่อแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Schardl and Phillips, 1997) เช่น หญ้าที่มีราเอนโดไฟท์จะมีสารกลุ่ม alkaloid อยู่ จึงทำให้มีความต้านทานต่อแมลงที่กินใบ ราเอนโดไฟท์สามารถป้องกันการเกิดโรคในต้นกล้วย โดยมีผลลดการเข้าทำลายของตัวอ่อนด้วงชนิด *Cosmopolites sordidus* และไส้เดือนฝอยชนิด *Radopholus similis* และราเอนโดไฟท์ *Phomopsis phaseoli* และ *Melanconium betulinum* สามารถสร้างสารเพื่อทำลายไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ซึ่งก่อโรคในพืช (Schwarz *et al*., 2004) นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์ *Verticillium* sp. ที่แยกได้จากรากของต้นโกฐขี้แมวสร้างสาร 2,6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one, massariphenone และ ergosterol peroxide มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pyricularia oryzae* P-2b (You *et al*., 2009)

5. ราเอนโดไฟท์ช่วยป้องกันราก่อโรคพืช (endophytic fungi as plant pathogen antagonist)

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการป้องกันพืชอาศัย ปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคอื่นๆ โดยทำการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อราก่อโรค เช่น ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium catenulatum* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Crinipellis perniciosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค witches' s broom ที่ก่อความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกต้นโกโก้ (Rubini *et al*., 2005) Hanada และคณะ (2008) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นโกโก้ พบว่าเชื้อ *Trichoderma martiale* ซึ่งเป็น new species สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าดำของโกโก้

6. ราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ (endophytic fungi producing antibiotic)

สารส่วนใหญ่จากราเอนโดไฟท์มีผลยับยั้งเชื้อราโรคพืช แบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต แต่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium* sp. จากต้น *Eucryphia cordifolia* สามารถผลิตสารจำพวกสารระเหยอินทรีย์ (volatile organic compounds, VOCs) ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Pythium ultimum* และ *Verticillium dahliae* (Stinson *et al*., 2003) และพบว่าราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* ที่แยกจากพืชในประเทศเขตร้อน สามารถผลิตสารจำพวก VOCs เมื่อวิเคราะห์ทางเคมีพบว่ามีสารอินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิดโดยยับยั้งเชื้อรา *P. ultimum*, *P. aphanidermatum*, *Phytophthora erythroseptica*, *Ph. cinnamomi*, *Aphanomyces cochliodiodes*, *Aspergillus fumigatus*, *A. ochraceus*, *Rhizoctonia solani*, *Glomerella cingulata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *V. dahliae*, *C. coccodes*, *Stachybotrys chartarum* ต้านเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* และเมื่อนำ *M. albus* ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับพืชพบว่าสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา *Ph. capsici* และ *R. solani* สาเหตุของ damping-off และ root rot ตามลำดับ และยังมีผลยับยั้ง potato tuber moth (*Phtorimaea operculella*) แมลงที่เป็นศัตรูธรรมชาติของมันฝรั่ง (Lacey and Neven, 2006)

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

การเก็บตัวอย่างต้นพืชเพื่อนำมาแยกเอนโดไฟท์ ควรเลือกเก็บต้นที่มีลักษณะการเจริญปกติสมบูรณ์ ไม่มีอาการของโรค และควรทำการแยกภายใน 24 ชั่วโมง (สายสมร ลำยอง และคณะ, 2541; Fisher *et al*., 1986) สำหรับวิธีการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชอาศัยในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถบ่งชี้ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเอนโดไฟท์ที่แท้จริง วิธีการที่ใช้ได้นำมาจากรายงานต่างๆ คือ การทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิวของพืชที่นำมาใช้แยก (สายสมร ลำยอง และคณะ, 2541)

แต่ดัดแปลงให้เหมาะสมกับสภาพของเนื้อเยื่อพืชตัวอย่าง วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิวทำได้โดยเลือกชิ้นส่วนของพืชจากต้นที่สมบูรณ์ นำมาล้างผ่านน้ำไหล แล้วนำชิ้นพืชมาจุ่มในเอทธานอล (ethanol) และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) เจือจาง ตามด้วยเอทธานอลอีกครั้ง ซึ่ง Spurr และ Welty (1975) พบว่า การเพิ่มแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite และช่วยให้ชิ้นพืชเปียกอย่างทั่วถึง หลังจากฆ่าเชื้อแล้ววางชิ้นพืชในจานอาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังรายงานวิจัยต่อไปนี้

เลขา มาโนช และคณะ (2544) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบกล้วยไม้ป่า 3 ชนิด โดยนำใบพืชปกติมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 3x3 ตารางมิลลิเมตร แช่ใน เอทธานอล 70%นาน 10 นาที และแช่ใน clorox 10% นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างพืชมาซับบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซับชิ้นตัวอย่างพืชเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเลี้ยงในอาหาร PDA

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย (2549) คัดแยกเชื้อราเอนไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia* โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* ที่ไม่มีอาการของโรค เก็บตัวอย่างต้นละ 5 ใบ และ 5 กิ่ง โดยพืช 1 ชนิด เก็บตัวอย่าง ชนิดละ 1-3 ต้น นำตัวอย่างพืชมาแยกราเอนโดไฟท์ทันที โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent และน้ำประปา ผึ่งให้แห้งภายใต้ laminar flow เมื่อตัวอย่างพืชแห้ง ตัดส่วนของ เส้นใบ เส้นกลางใบ เนื้อใบ ก้านใบ และกิ่ง เป็นชิ้นขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้น ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ในเอทธานอล 95% นาน 30 วินาที แช่ใน 5% sodium hypochlorite นาน 5 นาที นำไปแช่ในเอทธานอล 95% นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 3-5 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3- 5 วัน ตัดปลายเส้นใย เลี้ยงบนอาหาร PDA

Bayman และคณะ (1996) คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนรากและใบของพืชในสกุล *Lepanthes* นำใบและรากมาล้างผ่านน้ำ ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในเอทธานอล 75% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 3.4% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที และแช่ในเอทธานอล 75% เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำตัวอย่างรากมาตัดตัวอย่างละ 6 ชิ้น ขนาด 2-5 มิลลิเมตร และตัวอย่างใบนำมาตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร บริเวณปลายใบ กลางใบ และโคนใบ และตัดแบ่งครึ่งอีกครั้ง นำชิ้นส่วนจากรากตัวอย่างละ 3 ชิ้น

และตัวอย่างจากใบที่ตัดแบ่งเป็นครึ่งวงกลม วางบนอาหาร half-strength malt extract agar (MEA) ที่ผสม rose bengal ความเข้มข้น 35 mg/ L บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส โคโลนีของเชื้อราที่ได้ให้ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MEA หรือ V8 juice agar

Liu และคณะ (2001) คัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อลำต้นของ *Artemisia annua* โดยนำส่วนของลำต้น *A. annua* มาล้างผ่านน้ำ และนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เอทธานอล 75% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน 5% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นตัวอย่างพืชมาตัดเป็นแท่งขนาด 1 เซนติเมตร จาก 1 แท่งให้ตัดแบ่งเป็น 2 แท่งตามแนวตั้งตรง นำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 150 mg/L และ streptomycin 100 mg/L เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญรอบๆ ชิ้นส่วนของตัวอย่าง คัดเลือกเชื้อราให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ได้เหมือนกับวิธีการข้างต้น

Kim และคณะ (2007) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบ ลำต้น และรากของพืชผัก 5 ชนิด คือ พริก แตงกวา มะเขือเทศ ฟักทอง และผักกาดขาวจีน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่ปกติ 3-5 ต้นต่อพื้นที่ นำตัวอย่างพืชมาทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำและผึ่งให้แห้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ตัวอย่างพืชในเอทธานอล 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน 5% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และนำมาเลี้ยงบนอาหาร malt extract agar (MEA) ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้น 50 mg/ L โดยวางชิ้นตัวอย่าง 4 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญทำการถ่ายเชื้อโดยใช้อาหาร patato dextrose agar (PDA)

การใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คือ วิธีการใดก็ตามที่ควบคุมโรคพืชหรือลดปริมาณหรือผลของเชื้อสาเหตุ โดยอาศัยกลไกทางชีววิทยาหรือสิ่งที่มีชีวิตอื่นๆ หรือการใช้ปฏิปักษ์ในสิ่งแวดล้อมเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคพืช และพืชอาศัย เพื่อลดปริมาณของเชื้อสาเหตุของโรคพืชลง (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2544) ซึ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น เป็นการควบคุมที่ไม่เพียงแต่เป็นการลดความหนาแน่นของเชื้อที่ก่อโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการป้องกันบนผิวหน้าของพืชและในพืชอาศัยด้วย แสดงบทบาทการสร้างความต้านทาน (resistance) หรือเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ต่อต้านเชื้อโรคภายหลังการติดเชื้อ หรือการชักนำให้เกิดความต้านทานของพืชอาศัย (host plant resistance) ต่อเชื้อโรค จุลินทรีย์ต่อต้านจัดเป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีที่มีศักยภาพต่อการขัดขวางกระบวนการต่างๆ ของเชื้อโรคพืชที่มีชีวิต (เกษม สร้อยทอง,

2551) เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) จะประสบความสำเร็จในการควบคุมเชื้อสาเหตุได้นั้นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุ ส่วนใหญ่เชื้อปฏิปักษ์ที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคจะเป็นเชื้อที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อสาเหตุโรค (William, 1982)

การเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2540)

1. การเป็นปรสิต (parasite) หมายถึง การที่เชื้อปฏิปักษ์เข้าทำลายส่วนต่างๆ ภายในของเชื้อสาเหตุโรคได้โดยตรง บางครั้งเรียกเชื้อปฏิปักษ์นี้ว่า hyperparasite

2. การเป็นตัวห้ำ (predator) เป็นวิธีการที่คล้ายกับการเป็นปรสิต แตกต่างกันที่วิธีการกินหรือทำลาย กล่าวคือ การเป็นตัวห้ำเป็นการกินทั้งตัว

3. การแข่งขันกันเอง คือ การที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งเข้าไปยึดครองพื้นที่หรืองอกเจริญเติบโตก่อนเชื้อสาเหตุของโรคพืชจะสามารถเข้าทำลายพืชได้

4. การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

5. การสร้างภูมิต้านทาน ในที่นี้หมายถึงการใช้สายพันธุ์ของเชื้อโรคที่อ่อนแอหรือจุลินทรีย์คนละกลุ่มกันและไม่เกี่ยวข้องกันเลยพ่นหรือปลูกในต้นพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสายพันธุ์ที่รุนแรงกว่า

ศิริรัตน์ ใจแล (2546) ศึกษาการควบคุม *Bipolaris sorokiniana* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวบาร์เลย์ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ในต้นหญ้า โดยทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ จากใบและรากของต้นหญ้า 3 ชนิด คือ หญ้าคา (cogon grass : *Imperata cylindrica*) หญ้าแห้วหมู (nutgrass : *Cyperus rotundus*) และ หญ้าแขม (common reed : *Phragmites vallataria*) ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. sorokiniana* ด้วยวิธี dual culture หลังจากนั้นคัดเลือกเชื้อมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. sorokiniana* โดยวางเชื้อราเอนโดไฟท์ก่อนเชื้อสาเหตุ 2 วัน วางเชื้อราเอนโดไฟท์พร้อมกับเชื้อสาเหตุ และวางเชื้อราเอนโดไฟท์หลังเชื้อสาเหตุ 2 วัน พบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia Sterilia (4) T_5UL003 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *B. sorokiniana* สูงสุด คือ 93.01% 79.27% และ 72.77% ในการทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ และพบว่าการแช่เมล็ดและพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของ Hyphomycetes (7) T_3UL007 ลดเชื้อที่ติดมากับเมล็ด และลดระดับการเกิดโรคลงได้ต่ำสุดเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่เมล็ดข้าวบาร์เลย์ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ก่อนปลูกในกระถางช่วยเพิ่มความงอกให้กับต้นกล้าของข้าวบาร์เลย์

เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง (2547) แยกเชื้อเอนโดไฟท์จากส่วนต่างๆ ของต้นช้าพลูและคาวตอง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุ

โรคแอนแทรคโนสของพริก ด้วยวิธี dual culture พบว่า *Chaetomium* sp. No. 357 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* ได้ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ culture filtrate ของเชื้อรา *Chaetomium* sp. No. 357 ในการยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* บนอาหาร PDA ที่ผสม culture filtrate แสดงผลการยับยั้งได้ 100% การทดสอบผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อความงอกของเมล็ดพริกปกติ พบว่ากรรมวิธีที่แช่ด้วยเชื้อรา *Sclerococcum* sp. No. 142 ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด ส่วนเมล็ดพริกที่ปลูกด้วยเชื้อ *C. capsici* ก่อน แล้วบ่มเชื้อไว้หนึ่งคืน แล้วจึงแช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วย *Chaetomium* sp. No. 357 ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด และเมื่อเพาะในดินก็ให้ผลในทางเดียวกัน สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุในโรงเรือน โดยทำการแช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดต่างๆ ก่อนปลูก พบว่า กรรมวิธีที่แช่ด้วยเชื้อรา *Sclerococcum* sp. No. 142 มีดัชนีการทำลายของโรคน้อยที่สุด (6.5%) กรรมวิธีที่ฉีดพ่นต้นพริกด้วย *Chaetomium* sp. No.357 ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุ มีดัชนีการทำลายของโรคน้อยที่สุด (4.75%) และทุกกรรมวิธีให้ผลในการควบคุมโรคได้ดี เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา Ascomycetes 2 No. 423 หลังปลูกเชื้อสาเหตุ

จิตรา เกาะแก้ว และคณะ (2550) ศึกษาชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์บนพืชสมุนไพร พบราเอนโดไฟท์ 210 สายพันธุ์ (isolate) จัดเป็นรา Hyphomycetes 25 สายพันธุ์ จำแนกได้ 7 สกุล 6 ชนิด Coelomycetes 135 สายพันธุ์ 5 สกุล 3 ชนิด Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ และราที่ไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ จำนวน 55 สายพันธุ์ ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด บนอาหาร PDA พบว่าราเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์จำนวน 5 สายพันธุ์ และรา *Pestalotiopsis* sp. 1 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternata*, *B. maydis*, *L. theobromae*, *Ph. palmivora* และ *S. rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

Greulich และคณะ (1999) ทดสอบใช้เชื้อ *Epichole typhina* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค chock ของหญ้า timothy ซึ่งสามารถอยู่ภายในเซลล์ของต้นและใบของหญ้า timothy ได้นานโดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค มาควบคุมเชื้อ *Cladosporium phlei* สาเหตุของโรค purple leaf spot ซึ่งถือเป็นโรคที่สำคัญของหญ้า timothy ในแปลงทดลอง พบว่า ในต้นที่ปลูกเชื้อ *E. typhina* สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อ *Cl. phlei* ได้ถึง 91% ส่วนในต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ *E. typhina* เชื้อ *Cl. phlei* เข้าทำลายได้ถึง 91%

Alstrom (2000) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากของ oilseed rape ได้แก่เชื้อ *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Fusarium* และ *Alternaria* นำมาใช้ต่อต้านเชื้อ *Verticillium dahliae* สาเหตุของโรคเหี่ยว พบว่า ในต้นกล้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์นี้สามารถยับยั้งเชื้อ *V. dahliae* โดยทำให้การพัฒนาของโรคช้าลง ไม่ทำให้เกิดโรคเพิ่มขึ้น และยังพบอีกว่าในบางไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์ทำให้น้ำหนักแห้งของรากต้น oilseed rape เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Narisawa และคณะ (2000) ทดสอบปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Heteroconium chaetospira* ที่แยกได้จากรากของผักกาดขาว ลงบนต้นกล้า พบว่าหลังจาก 3 เดือน ที่ย้ายต้นกล้าไปปลูก สามารถลดการเกิดโรครากบวมได้ 52-97% และลดการเกิดโรค Verticillium yellow ได้ 46-67% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และพบว่าเชื้อรา *H. chaetospira* สามารถเจริญได้ในต้นพืช 18 ชนิด โดยไม่ทำให้เกิดโรค แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีพืชอาศัย (host range) กว้าง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรครากบวม และ Verticillium yellow ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Brown และคณะ (2002) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากทุเรียนในรัฐควีนแลนด์เหนือ ประเทศออสเตรเลีย พบเชื้อรา *Phomopsis* sp., *C. gloeosporioides*, *L. theobromae*, *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Phyllosticta* sp., *Curvularia* sp., สมาชิกของ Basidiomycetes และ Xylariaceae จากนั้นคัดเลือกเชื้อราจำนวน 46 morphotypes มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Ph. palmivora* UQ3824 สายพันธุ์รุนแรง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 65% สามารถลดการเจริญของ *Ph. palmivora* ในอาหารได้ และกล่าวว่าเชื้อราเอนโดไฟท์มีความเป็นประโยชน์มากกว่า epiphytic antagonists ในแง่ของการปรับใช้ในสภาพแปลงปลูก

Dingle และ McGee (2003) ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* สาเหตุโรคราสนิม และเชื้อราเอนโดไฟท์ในข้าวสาลี พบว่าเอนโดไฟท์สามารถลดความหนาแน่นและขนาดของแผล (pustule) ในข้าวสาลีพันธุ์อ่อนแอ โดยปฏิกิริยาระหว่างเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อ *Puccinia* มีความเป็นไปได้ที่เกิดกลไกการป้องกันโดยเกิดการชักนำขึ้นในต้นข้าวสาลี

Kim และคณะ (2007) ศึกษาราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชผัก 5 ชนิด ได้แก่ แตงกวา พริก มะเขือเทศ ฟักทอง และ ผักกาดหอมจีน จากใบ ลำต้น และราก สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้ง *Ph. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และ oomycetes ตัวอื่นๆ โดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์สามารถต่อต้านเชื้อรา *Ph. infestans* ซึ่งประเมินค่าได้มากกว่า 90% โดยเชื้อ *Fusarium oxysporum* strain EF119 ที่แยกได้จากรากของพริกมีประสิทธิภาพในการต่อต้านโรคใบไหม้ของมะเขือเทศมากที่สุด และยัง

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. ultimum* และ *Ph. capsici* และสรุปว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้สามารถนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศโดยชีววิธี

Ownley และคณะ (2008) ทดสอบความสามารถการมีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อ *Beauveria bassiana* 11-98 ซึ่งแยกได้จากเนื้อเยื่อมะเขือเทศและฝ้ายที่ปลูกด้วยเมล็ดที่แช่ด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *B. bassiana* 11-98 พบว่า เชื้อสามารถเจริญในเนื้อเยื่อต้นกล้าของพืชทั้ง 2 ชนิดได้ และสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรค damping-off ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rh. solani* และโรครากและโคนเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Pythium myriotylum* จากการแยกเชื้อกลับจากเนื้อเยื่อส่วน ราก ลำต้น และใบ ของต้นกล้ามะเขือเทศ ฝ้าย และ snap bean พบว่าจำนวนเชื้อที่เจริญจากเนื้อเยื่อพืชมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *B. bassiana* 11-98 ที่ใช้แช่เมล็ด และจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยของเชื้อ *B. bassiana* 11-98 เจริญผ่าน epithelial cell, palisade parenchyma และ mesophyll ของเนื้อเยื่อใบพืช

Naik และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายและการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ซึ่งแยกได้จากใบและรากของต้นข้าว สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 570 ไอโซเลท ทำการแยกเชื้อ 2 ช่วง คือ ในช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน พบว่า ในฤดูหนาวสามารถแยกจากรากได้ 40.30 เปอร์เซ็นต์ และจากใบ 25.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในฤดูร้อนแยกเชื้อจากรากได้ 20.15 เปอร์เซ็นต์ และจากใบ 8.66 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มของเชื้อที่พบมากได้แก่ *Streptomyces* sp., *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* และ *Cladosporium cladosporioides* ความถี่ในการเจอเชื้อแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่ ฤดูและสายพันธุ์ของข้าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rh. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae*, *Phoma sorghina* และ *Alternaria alternata* พบว่าเชื้อ *C. globosum*, *P. chrysogenum* และ *Streptomyces* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดี

You และคณะ (2009) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากของต้นโกฐขี้แมว (*Rehmannia glutinosa*) เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสาร antifungal metabolites พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อ *Verticillium* sp. มีประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* P-2b จากการนำน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Verticillium* sp. ทดสอบทางเคมี พบสาร 3 กลุ่มคือ 2,6-dihydroxy-2-methyl-7-(prop-1E-enyl)-1-benzofuran-3(2H)-one, massariphenone และ ergosterol peroxide

Hanada และคณะ (2010) ศึกษาราเอนโดไฟท์จากลำต้นและกิ่งของต้นโกโก้และต้น *Theobroma grandiflorum* สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 103 ไอโซเลท นำเชื้อรา

เอนโดไฟท์ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ph. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าดำของผลโกโก้ พบว่าเชื้อ *Trichoderma* 8 ไอโซเลท, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Tolypocladium* และ *Fusarium* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ในระดับสูง และเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ จากการทดสอบการใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เชื้อราเอนดไฟท์เหล่านี้ยังสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นโกโก้

แบคทีเรียเอนโดไฟท์

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในต้นพืชแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) โดยไม่ทำอันตรายต่อพืช (Bunn and Tan, 2002) และสามารถผลิตสารบางชนิดที่ส่งเสริมการเจริญของพืชอาศัย (Lata *et al*., 2006) และผลิตสารบางชนิดช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้ด้วย (Gabriel and Upali, 2006)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ สามารถแบ่งได้เป็นหลายกลุ่ม เช่น

- Aerobes เช่น *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Derxia*
- Facultative anaerobes เช่น *Clostridium*, *Pseudomonas* และ *Rhizobium*
- Heterotrophs เช่น *Klebsiella* และ *Enterobacter*
- Phototrophs เช่น *Anabaena*, *Azospirillum* และ *Nostoc*
- Diazotrophs หมายถึงจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยน di-nitrogen (N_2) จากบรรยากาศไปเป็น ammonia (NH_3) ด้วย electron reduction และ protonation ของก๊าซ N_2 ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของ nitrogenase enzyme complex ที่อยู่ภายในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนดังกล่าว ดังนั้นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์หรือ endophytic diazotroph bacteria คือแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แล้วสามารถตรึงไนโตรเจนและเป็นประโยชน์แก่พืชนั้นได้โดยไม่ทำอันตราย หรือก่อให้เกิดโรคแก่พืชดังกล่าว

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งตามความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและพืช ได้แก่ กลุ่ม associative หมายถึง แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใช้ชีวิตส่วนมากอาศัยอยู่ที่บริเวณผิวนอกของเซลล์ และบางครั้งอาศัยอยู่ที่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ ส่วน symbiotic หมายถึง แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ใช้ชีวิตส่วนมากอยู่ภายในเซลล์ของพืช การ associate หรือ symbiosis ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ กับพืชนั้นไม่มีความจำเพาะเจาะจง อาจพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อหลายชนิดภายในพืชเดียวกันก็ได้ ตัวอย่างเช่น

Azospirillum brasilense Sp245 ที่อาศัยอยู่ทั้งภายในรากของข้าวสาลี ที่ตำแหน่งรากแขนง และบริเวณรากขน และพบที่ท่อลำเลียงน้ำในรากของข้าวสาลีที่เพาะปลูกในประเทศบราซิล ในขณะที่ *A. brasilense* Sp7 พบที่บริเวณพื้นผิวราก เท่านั้น (Baldani *et al.*, 1986)

ตัวอย่างแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชชนิดต่างๆ และความสามารถในการควบคุมโรคพืช ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ

ชนิดพืช	ตำแหน่งที่แยกเชื้อ	สายพันธุ์เชื้อที่พบ	ควบคุมเชื้อ	อ้างอิง
1. ฝ้าย (*Gossypium* spp.)	Internal tissue	*Aureobacterium rubiacerum*, *Pseudomons putida* และ *Burkholderia solanacearum*	โรคเหี่ยวของฝ้าย ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*	Chen และคณะ (1995)
2. ฝ้าย (*Gossypium* spp.)	ราก	*Burkholderia* และ *Phyllobacterium*	*Meloidogyne incognita*	Hallmann และคณะ (1999)
3. กะหล่ำ (*Brassica oleracea*)	ใบ	*Kluyvera* และ *Alcaligenes*	โรคเน่าดำของพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	Assis และคณะ (1998)
4. มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*L.)	หัว	*Curtobacterium*, *Pseudomonas*	เชื้อ soil-borne กลุ่ม *Fusarium* spp. และ *Phytophthora infestans*	Sturz และคณะ (1999)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดพืช	ตำแหน่งที่แยกเชื้อ	สายพันธุ์เชื้อที่พบ	ควบคุมเชื้อ	อ้างอิง
5. ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	ราก	*B. subtilis*	โรค take-all ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Gaeumannomyces graminis*	Liu และคณะ (2009)
6. ข้าว (*Oryza sativa* L.)	ใบและลำต้น	*B. licheniformis*	*Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani, Botrytis cinereapers, Gibberella zeae, Dothiorella gregaria* และ *Colletotrichum gossypii*	Wang และคณะ (2009)
7. Holly plants (*Ilex latifolia* Thunb)	ลำต้น	*B. vallismortis*	*Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* และ *Phytophthora capsici*	Zhao และคณะ (2010)

การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

การเก็บตัวอย่างต้นพืชเพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์และวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์นั้นหลักการโดยทั่วไปเหมือนกับการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์กลุ่มที่มีความสำคัญและทำการศึกษากันมาก เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์กลุ่มที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืช สำหรับการแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ออกจากพืชเพื่อการศึกษานั้นไม่สามารถทำได้ง่ายเนื่องจาก แบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาได้จากตัวอย่างพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิว และใช้ N-deficient media พบว่าประมาณ 90% เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (non-diazotrophs) (Barraquio et al., 1997) แบคทีเรียบางกลุ่มเช่น *Azoarcus* sp. BH72 ไม่สามารถแยก และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ตัวอย่างการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ดังต่อไปนี้

Bacilio-Jimenez และคณะ (2001) ศึกษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในเมล็ดข้าว โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อในระบบที่ปลอดเชื้อ เมื่อต้นกล้าอายุ 15 วัน นำส่วนรากของต้นกล้าข้าวมาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยนำรากมาล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำรากที่ชั่งน้ำหนักแล้วมาใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 16 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ supernatant ปริมาตร 50 ไมโครลิตร spread plate บนอาหาร Py culture medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญเร็วบนอาหารหลังจากบ่มเชื้อนาน 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าตรวจดูการเจริญของเชื้อจนถึงสัปดาห์ที่ 2

Hung และ Annapurna (2004) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากราก ลำต้น และปมรากของต้นถั่วเหลือง โดยนำตัวอย่างมาล้างผ่านน้ำ ลำต้นและรากตัดให้มีขนาด 2-3 เซนติเมตร และนำตัวอย่างแช่น้ำกลั่นและจากนั้นเทน้ำกลั่นทิ้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เอทธานอล 70% เป็นเวลา 30 วินาที รากและปมแช่ 0.1% $HgCl_2$ เป็นเวลา 3 นาที ส่วนลำต้นแช่ 0.1% $HgCl_2$ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 ครั้ง นำชิ้นตัวอย่างพืชบดให้ละเอียด จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่าง 10^{-1}-10^{-6} เท่า แยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate บนอาหาร PDA และ TSA

Moore และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ของต้น poplar โดยแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากราก ลำต้น และใบ ส่วนของรากนำมาล้างด้วยน้ำ ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 2% NaOCl นาน 10 นาที ล้างด้วย deionised H_2O 3 ครั้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาเติม 1 mM $MgSO_4$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดด้วยเครื่อง Potter-Elvejhem Homogeniser แยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหาร 869 agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ส่วนของลำต้นตัดให้มีขนาด 2 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 1% NaOCl

นาน 5 นาที ล้างด้วย deionised H_2O 3 ครั้ง สกัดน้ำคั้นจากส่วน xylem โดยใช้เครื่อง Scholander pressure bomb จากนั้นนำน้ำคั้นที่ได้มาแยกเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร 869, 1/10 869, Schatz medium(Sz) และ อาหาร Sz+C mix บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัวอย่างใบทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 2% NaOCl นาน 10 นาที ล้างด้วย deionised H_2O 3 ครั้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อ 0.6 กรัม มาเติม 1 mM $MgSO_4$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดด้วยเครื่อง Potter-Elvejhem Homogeniser แยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหาร 869 agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลือกเก็บโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารที่มีลักษณะโคโลนีแตกกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน

Forchetti และคณะ (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรากต้นทานตะวัน นำตัวอย่างรากมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เอทธานอล 70% และแช่ใน 3% NaOCl จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างรากบดด้วยครกบดตัวอย่างซึ่งใส่ 0.9% NaCl (1:10) นำตัวอย่างที่บดแล้วหนัก 1 กรัม ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย 0.9% NaCl แยกเชื้อด้วยวิธี spread plate ใช้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2}-10^{-7} เท่า บนอาหาร nutritive agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นย้ายเชื้อที่เจริญมาเลี้ยงบนอาหาร yeast manitol medium (YEM), red congo (RC) หรือ nitrogen-free base (Nfb) ชนิดใดชนิดหนึ่ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

Shi และคณะ (2010) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากผลมะละกอ นำผลมะละกอมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการจุ่มในเอทธานอล 750 ml/L เป็นเวลา 5 วินาที และแช่ใน 1 g/L Hg_2Cl_2 นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง วางให้แห้งใน sterile chamber จากนั้นนำส่วนเปลือกของมะละกอที่ปราศจากเชื้อหนัก 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ในครกบดที่ปราศจากเชื้อ ทำ serial dilution 10^{-1}-10^{-5} เท่า แยกเชื้อโดยวิธีการ spread plate บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะที่แตกต่างกันนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

บทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ และหน้าที่ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตามบทบาทที่มีต่อพืชอาศัย ดังนี้

1. แบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่งเสริมการเจริญของพืช

เป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth regulators PGRs) หรือ phytohormones ได้แก่ IAA, gibberellins, cytokinins, ethylene และ abscisic acid สารเหล่านี้มีผลในการกระตุ้นการเจริญของพืชในหลาย ๆ ด้าน ซึ่งเมื่อร่วมกับธาตุอาหารพืชก็จะทำให้พืชเจริญได้ดีขึ้น จุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถผลิต PGRs ออกมาเหมือนกับที่พืชผลิตเอง (Baldani *et al*., 1997)

2. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์

เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนจากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของ nitrogenase enzyme complex ที่อยู่ภายในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ เพราะช่วยให้พืชหลั่ง phytohormones ไปสู่พื้นผิวราก ทำให้เพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร รากของพืชที่มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์กลุ่ม *Azospirillum* sp., *Acetobacter diazotrophicus* และ *Herbaspirillum seropedicae* พบ auxins และ gibberellins ในปริมาณที่สูง (Bastian *et al*., 1998)

3. แบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของเอนไซม์

มีการศึกษาถึงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ที่สร้างเอนไซม์หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในพืช เช่น เชื้อ *Serratia* sp. มีความสามารถในการเพิ่มกิจกรรมของพืชให้มีการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้มากขึ้น ซึ่งมีผลในการเพิ่มอัตราการเจริญของพืช ทำให้พืชสูงขึ้น เช่นในข้าวจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสยังทำให้องค์ประกอบของโปรตีนและคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้น (Sandhiya *et al*., 2005)

4. แบคทีเรียเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืชจากเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ

แบคทีเรียเอนโดไฟท์มีบทบาทในการปกป้องพืชอาศัยจากสาเหตุของโรคพืชต่างๆ โดยทำการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อสาเหตุก่อโรค เช่น เชื้อ *P. agglomerans* ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อรากของข้าวนอกจากจะสามารถผลิต IAA ยังสามารถปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคพืช (Verma *et al*., 2001) เชื้อ *Pseudomonas* sp. strain PsJN ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหัวหอมสามารถยับยั้งเชื้อ *Botrytis cinerea* (Barka *et al*., 2002)

การใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

Chen และคณะ (1995) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อของฝ้ายเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรค vascular wilt ของฝ้าย จากการทดลองปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนต้นกล้าของฝ้ายอายุ 7 วัน โดยการทำแผลบนลำต้นด้วยเข็มและป้ายเชื้อลงบนบริเวณที่ทำแผล หลังจากนั้น 10 วัน ทำการฉีดเชื้อก่อโรคทางลำต้น ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ INR-6, JM-1128, JM-1137, CC-186, 89B-61 และ JM-869 ซึ่งจำแนกได้เป็นเชื้อ *Aureobacterium saperdae*, *Bacillus pumilus*, *Phyllobacterium rubiacearum*, *Pseudomonas putida*, และ *Burkholderia solanacearum* (ปัจจุบัน *Ralstonia solanacearum*) ตามลำดับ สามารถลดความรุนแรงของโรคได้

Nejad และ Johnson (2000) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อปกติของต้น oilseed rape และต้นมะเขือเทศ และศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Verticillium dahliae* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุของโรคเหี่ยวใน oilseed rape และมะเขือเทศพบว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และเมื่อทำการทดสอบกับเมล็ด (seed treatment) โดยการคลุกเมล็ดและปลูกในดินที่ผสมด้วยเชื้อโรคแต่ละตัว พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิด และยังกระตุ้นการงอกของเมล็ดและเพิ่มความสูงของต้นกล้า oilseed rape และมะเขือเทศ

Forchetti และคณะ (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นทานตะวันซึ่งปลูกในสภาวะที่แห้งแห้ง เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ทนต่อสภาวะที่กดดัน และศึกษาความสามารถของเชื้อในการผลิต jasmonates (JAs) และ abscisic acid (ABC) พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสนใจ 8 ไอโซเลท (SF1-SF8) จากการทำ sequence เชื้อพบว่าเชื้อแบคทีเรีย เอนโดไฟท์ไอโซเลท SF2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Achromobacter xiloxidans* หรือ *Alcaligenes* sp. 99.9% ในขณะที่อีก 7 ไอโซเลท ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus pumilus* 99.9% จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. orense* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ดี แต่ยับยั้งเชื้อ *Alternaria* sp. ได้น้อย

Padgham และ Sikora (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากบริเวณส่วนรากของต้นข้าว สำหรับใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* พบว่าเชื้อ *B. megaterium* สามารถลดการเข้าทำลายของ *M. graminicola* และลดขนาดของปมได้ดีกว่าชุดควบคุม 40 เปอร์เซ็นต์ และยังมีผลในการทำให้ *M. graminicola* บริเวณรากของต้นข้าวลดปริมาณลงได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อทำการแช่ไข่ของ

M. graminicola ด้วย secondary metabolites ของ *B. megaterium* พบว่าสามารถลดอัตราการออกจากไข่ของ *M. graminicola* ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์

Melnick และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชผัก ในการมีชีวิตอยู่ของเชื้อภายในต้นกล้าของต้นโกโก้ และความสามารถของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ในการลดความรุนแรงของโรคผลเน่าดำของโกโก้ ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora capsici* จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B. cereus* BT8 ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศ *B. cereus* BP24 ซึ่งแยกได้จากมันฝรั่ง สามารถมีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อใบโกโก้ได้นานกว่า 68 วัน และสามารถลดความรุนแรงของโรคบนใบโกโก้ได้อย่างมีนัยสำคัญ

Ulrich และคณะ (2008) ศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ของต้น poplar, larch และ spruce ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 5 ปี พบว่าจากการทำ sequence 16S rRNA เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในจีนัส *Paenibacillus* และเชื้ออื่นๆ ที่พบ เช่น *Methylobacterium*, *Stenotrophomonas* และ *Bacillus* จากการปลูกเชื้อ *Paenibacillus* ไอโซเลท 22 ในต้น poplar ที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีจำนวนรากเพิ่มมากขึ้นและความยาวของรากมากกว่าชุดควบคุมหลังการปลูกเชื้อ 3 สัปดาห์

Ramesh และคณะ (2008) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากมะเขือยาว แตงกวา และถั่ว จากแหล่งต่างๆ ของเมือง Goa ประเทศอินเดีย ในเบื้องต้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ 28 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือยาว เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มากกว่า 50% เป็นเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* จากการทดลองปลูกเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลท EB9 และ EB67 เชื้อ *Enterobacter* ไอโซเลท EB44 และ EB89 และเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลท EC4 และ EC13 ร่วมกับเชื้อโรคในโรงเรือน พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีผลให้ต้นกล้าเจริญได้ดีขึ้น

Wang และคณะ (2009) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคผลเน่าของมะเขือเทศ ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายระหว่างการเก็บรักษา เพื่อลดการใช้สารเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท จาก 238 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท EB-15, EB-28 และ EB-122 ซึ่งแยกได้จาก *Lycopersicum esculentum*, *Speranskia tuberculata* และ *Dictamnus dasycarpus* ตามลำดับ ให้ผลเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture พบว่า ไอโซเลท EB-28 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ 71.1% ส่วนการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคบนใบของมะเขือเทศ สามารถยับยั้งได้ 52.4 %

จากการจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีและจากการวิเคราะห์ โดยการทำ 16S rDNA sequence เชื้อ EB-28 คือเชื้อ *Bacillus subtilis*

Dias และคณะ (2009) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อเจริญของสตรอเบอรี่ จากการบ่งชี้เชื้อโดยการวิเคราะห์ FAME profile พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Bacillus* และ *Sphingopyxis* ทดสอบคุณสมบัติการผลิต indole acetic acid และ phosphate ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการเจริญของพืช ผลการทดลองพบว่าเชื้อ 15 สายพันธุ์ ผลิต IAA ปริมาณสูง และอีก 20 สายพันธุ์ ผลิต phosphate และจากการทดสอบการประเมินประสิทธิภาพของการกระตุ้นการเจริญของพืช โดยประเมินจากจำนวนราก ความยาวและน้ำหนักแห้งของส่วนที่อยู่เหนือดิน พบว่าเชื้อ *Bacillus* 7 สายพันธุ์ สามารถกระตุ้นการเจริญของราก และเชื้อ *Sphingopyxis* 1 สายพันธุ์ กระตุ้นการเจริญของลำต้น การเจริญของพืชแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการผลิต IAA และ phosphate solubilization จากข้อมูลแบคทีเรียมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของต้นกล้าสตรอเบอรี่

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกและจำแนกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพริกทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง บีกเกอร์ กระบอกตวง haemacytometer แผ่นสไลด์ และ cover slip
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคีม cork borer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่นๆ
3. กระดาษกรอง เบอร์ 2
4. paper disc
5. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
7. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
8. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
9. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture)
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด
11. ไมโครปิเปตต์
12. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
13. ตู้เย็น
14. ไมโครเวฟ
15. กล้องถ่ายรูป
16. วัสดุและอุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ เมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้า กระบะเพาะกล้า กระถางพลาสติก ขนาด 9 นิ้ว ถุงพลาสติกขนาด 8x16 นิ้ว ป้ายพลาสติก ดิน ปุ๋ยคอก แกลบ พลาสติกคลุมแปลง ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และ 13-13-21

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Malt extract agar (MEA)
2. Muller Hinton agar (MHA)
3. Potato dextrose agar (PDA)

4. V8 Juice Agar (VA)
5. Tryptic Soy Agar (TSA)
6. Nutrient agar (NA)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. sodium hypochlorite
2. 70% และ 95% ethanol
3. chloramphenicol
4. Absa 20
5. agar
6. barium chloride
7. beef extract
8. dextrose
9. glucose
10. lactophenol cotton blue
11. peptone
12. sodium carboxy methylcellulose
13. carboxin
14. carbendazim

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพริก

เก็บตัวอย่างต้นพริกที่ไม่เป็นโรค จากพื้นที่ต่างๆ เช่น จังหวัดสงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชุมพร และระนอง โดยเก็บส่วนของใบ กิ่ง และราก ใส่ในซองกระดาษหรือถุงพลาสติก และนำตัวอย่างพริกดังกล่าวมาแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

2. การแยกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

2.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

นำใบ กิ่ง และรากพริก มาล้างให้สะอาดโดยการล้างผ่านน้ำและผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วแช่ใน 0.44% sodium hypochlorite (NaOCl) นาน 5 นาที และล้างในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3x3 ตารางมิลลิเมตร ซับชิ้นตัวอย่างให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร Malt extract agar (MEA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้น 50 mg/L บ่มเชื้อไว้ 3 สัปดาห์ แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (Kim *et al*., 2007)

นับจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญออกมา เพื่อนำไปคำนวณหาค่า Isolate prevalence (Bussaban *et al*., 2001) ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$\text{Isolate prevalence} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญออกมา}}{\text{จำนวนชิ้นพืชที่วางทดสอบ}} \times 100$$

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

นำตัวอย่างต้นพริกได้แก่ส่วน ใบ ก้านใบ กิ่ง และราก มาล้างให้สะอาดโดยการล้างผ่านน้ำและผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3x3 ตารางมิลลิเมตร ชั่งชิ้นตัวอย่างพืชแต่ละส่วน หนัก 1 กรัม นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที แล้วแช่ใน 0.44% NaOCl นาน 4 นาที และล้างในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับชิ้นตัวอย่างให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นตัวอย่างใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วบดชิ้นตัวอย่างให้ละเอียดเจือจางตัวอย่างจนถึงความเข้มข้น 10^{-6} ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread plate บนอาหาร tryptic soy agar (TSA) บ่มเชื้อไว้ 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร nutrient agar (NA)

3. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

นำตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จำนวน 10 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยนำผลพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน แยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation โดยเขี่ยโคนิเดียเชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/L บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Sutton (1992) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหาร PDA เอียง เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคต่อไป

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

นำตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา จำนวน 10 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยตัดชิ้นส่วนใบพริกที่เป็นโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ให้มีเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่เป็นโรคเชื่อมต่อกัน ขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ตัดมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 0.88% NaOCl นาน 2 นาที บ่มเชื้อโดยวิธี standard blotter plate โดยวางเนื้อเยื่อพืชในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ตรวจดูลักษณะการเจริญและการสร้างโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular และ compound และแยกเชื้อราโดยวิธี single spore isolation โดยเขี่ยโคนิเดียเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางบนอาหาร PDA และ V8 juice agar (VA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/L บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Ellis (1971) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหาร PDA เอียง เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคต่อไป

3.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า

นำตัวอย่างต้นพริกที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่า จำนวน 10 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยนำเม็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนต้นพริก แช่ใน 0.88% NaOCl 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ วางเม็ดสเคลอโรเทียมบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Punja (1985) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหาร PDA เอียง เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคต่อไป

4. การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค

4.1 การพิสูจน์โรคแอนแทรคโนส

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่แยกได้จากข้อ 3.1 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา วางชิ้นวุ้นบนผลพริกชี้ฟ้าปกติไม่แสดงอาการโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl ทำแผลด้วยเข็มเขี่ย 2 แผลต่อผล ทดสอบไอโซเลทละ 4 ผล จากนั้นนำไปบ่มในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน คัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุดและแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

4.2 การพิสูจน์โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่แยกได้จากข้อ 3.2 บนอาหาร VA เป็นเวลา 12 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา วางชิ้นวุ้นบนใบพริกที่ปกติและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl ปลูกเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยทำแผล 1 แผลต่อใบ จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีละอองน้ำพรมอยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3 วัน คัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

4.3 การพิสูจน์โรครากและโคนเน่า

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าที่แยกได้จากข้อ 3.3 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำชิ้นวุ้นไปวางบริเวณโคนต้นพริกอายุ 2 เดือน ใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน คัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

5. การทดสอบความรุนแรงของรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อเป็นโรคของพริก

5.1 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนผลพริก

การพิสูจน์โรคทำโดยเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 จากข้อ 2 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 จากข้อ 3.1 ที่แยกได้บนอาหาร PDA ให้เชื้อมีอายุ 14 วัน ใช้ cork-borer เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำแผ่นวุ้นวางบนผลพริกชี้ฟ้าที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl และทำแผลบนผลพริกด้วยเข็มเขี่ย ทดสอบทั้งบนผลพริกเขียวและผลพริกแดง ทดสอบเชื้อไอโซเลทละ 5 ผล บ่มผลพริกในกล่องชื้น ตรวจการปรากฏของโรคหลังจากทำการวางชิ้นวุ้น 7 วัน คำนวณอัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคซึ่งสามารถคำนวณอัตราการเกิดโรค (%) ได้จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนผลพริกที่แสดงอาการของโรค}}{\text{จำนวนผลพริกทั้งหมดที่ทดสอบ}} \times 100$$

และวิเคราะห์ระดับความรุนแรงของโรคซึ่งวัดจากพื้นที่บนผลพริกที่แสดงอาการของโรคโดยใช้โปรแกรม DT-Scan ให้ระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่ปรากฏอาการของโรค

1 = 0 – 100 ตารางมิลลิเมตร

2 = 101 – 200 ตารางมิลลิเมตร

3 = 201 – 300 ตารางมิลลิเมตร

4 = มากกว่า 300.01 ตารางมิลลิเมตร

5.2 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนเมล็ดพริก

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 จากข้อ 2 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 จากข้อ 3.1 ที่แยกได้บนอาหาร PDA ให้เชื้อมีอายุ 14 วัน ทำสปอร์แขวนลอยโดยใช้น้ำฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราดังกล่าวเจริญอยู่ ใช้ loop ขูดผิวหน้าเส้นใยได้สปอร์แขวนลอย แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางปรับสปอร์แขวนลอย ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำเมล็ดพริกชี้ฟ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl เป็นเวลา 2 นาที แช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเมล็ดพริก

ชี้ฟ้า จำนวน 25 เมล็ด วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (standard blotter plate) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน แบ่งการทดลองเป็น 13 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 1

กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 2

กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 3

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 4

กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 5

กรรมวิธีที่ 7 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. capsici* End 6

กรรมวิธีที่ 8 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 1

กรรมวิธีที่ 9 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 2

กรรมวิธีที่ 10 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 3

กรรมวิธีที่ 11 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 4

กรรมวิธีที่ 12 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 5

กรรมวิธีที่ 13 แช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C capsici* Path 6

ประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้าหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 9 วัน โดยนับจำนวน acervulus ที่เจริญอยู่บนเมล็ดพริกชี้ฟ้าภายใต้กล้อง stereo binocular และให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคแอนแทรคโนส ดังนี้

ระดับ 0 : ไม่พบการเจริญของ acervulus บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า

ระดับ 1 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 1-5 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 2 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 6-10 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 3 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 11-15 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 4 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้ามากกว่า 16 acervuli ต่อเมล็ด

5.3 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนต้นพริก

การเตรียมพืช

เมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าในกระบะเพาะ ย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว

การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 จากข้อ 2 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 จากข้อ 3.1 ที่แยกได้บนอาหาร PDA ให้เชื้อมีอายุ 14 วัน เตรียมสปอร์แขวนลอยโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราดังกล่าวเจริญอยู่ ใช้ loop ขูดผิวหน้าเส้นใยได้สปอร์แขวนลอย แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางปรับสปอร์แขวนลอย ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบ

เมื่อต้นกล้าพริกอายุ 21 วัน ทำการพ่นต้นพริกด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อต้น คลุมถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นไว้ 24 ชั่วโมง แบ่งการทดลองเป็น 13 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 8 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 2 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 1
กรรมวิธีที่ 3 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 2
กรรมวิธีที่ 4 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 3
กรรมวิธีที่ 5 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 4
กรรมวิธีที่ 6 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* End 5
กรรมวิธีที่ 7 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. capsici* End 6
กรรมวิธีที่ 8 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 1
กรรมวิธีที่ 9 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 2
กรรมวิธีที่ 10 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 3
กรรมวิธีที่ 11 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 4
กรรมวิธีที่ 12 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. gloeosporioides* Path 5
กรรมวิธีที่ 13 พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C capsici* Path 6

ทำการวัดระดับการเกิดโรคในวันที่ 7 หลังการปลูกเชื้อ โดยดูลักษณะอาการที่ปรากฏบนใบ ให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคแอนแทรคโนส ดังนี้

0 = ไม่ปรากฏอาการของโรค

1 = 1-10 จุดแผลต่อต้นกล้า

2 = มากกว่า 10 จุดแผลต่อต้นกล้าและแสดงอาการใบไหม้

3 = แสดงอาการใบจุดรุนแรง, ใบไหม้, ใบเหลือง และใบร่วง 1 - 2 ใบต่อต้นกล้า

4 = แสดงอาการใบจุดรุนแรง, ใบไหม้, ใบเหลือง และใบร่วง 3 ใบ หรือมากกว่า 3 ใบต่อต้นกล้า

การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท End 1-6 และเชื้อรา *Colletotrichum* ไอโซเลท Path 1-6 จากเนื้อเยื่อพริกปกติ (Reisolation)

โดยแยกเชื้อจากใบพริกที่ไม่แสดงอาการของโรค หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ซึ่งทำการแยกเชื้อจากส่วนของใบและก้านใบ การแยกเชื้อราสามารถทำได้ตามวิธีการในข้อ 2 และประเมินผลการตรวจพบเชื้อราที่ทำการปลูกเชื้อ จากสูตร

ความถี่ของการ re-isolation (%)

$$= \frac{\text{จำนวนของชิ้นใบหรือก้านใบที่เชื้อ } \textit{Colletotrichum} \text{ เจริญออกมา}}{\text{จำนวนชิ้นใบหรือก้านใบทั้งหมดที่ทำการทดสอบ}} \times 100$$

6. การคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

6.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

6.1.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยนำเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

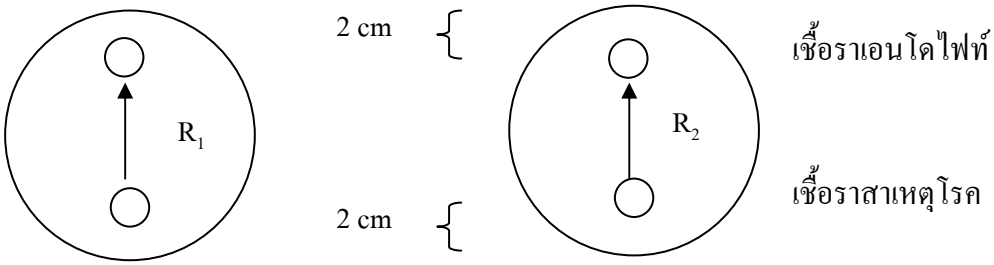
6.1.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์โดยนำเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์ซึ่งแยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาในการบ่มเลี้ยงเชื้อเท่ากันกับจำนวนวันที่ใช้เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค

6.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ซึ่งทำการคัดเลือกโดยวิธี dual culture plate โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะตัดชิ้นวุ้นจากโคโลนีเชื้อรา *S. rolfsii* อายุ 4 วัน นำไปวางบนอาหาร PDA ในจานทดสอบ โดยวางในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานให้ห่างจากขอบจานเข้ามาประมาณ 2 เซนติเมตร และด้านตรงข้ามให้วางเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีขนาดชิ้นวุ้นเท่ากันซึ่งตัดมาจากโคโลนีอายุเท่ากันกับเชื้อราสาเหตุโรค เชื้อเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้ชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth - PIRG)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG) = $\frac{(R_1-R_2)}{R_1} \times 100$



กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีทดสอบ

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยวิธี dual culture

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค ประเมินความสามารถในการยับยั้งได้ดังนี้ (เกษม สร้อยทอง, 2532)

> 75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61-75 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

51-60 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

< 50 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

6.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

6.2.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า โรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา โดยนำเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน 5 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ

6.2.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

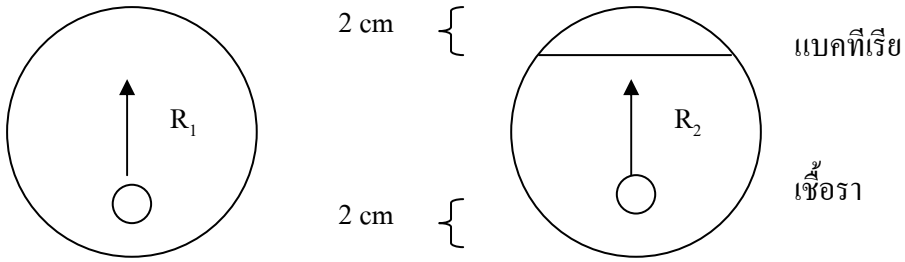
เตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ซึ่งแยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เบื้องต้น โดยนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มาขีดบนจานอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทั้ง 4 ด้านของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไว้ 24 ชั่วโมงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* นำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะอยู่ตรงกลางระหว่างรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยที่เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ไม่สามารถเจริญข้ามรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริกด้วยวิธี dual culture plate โดยนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* เบื้องต้น มาขีดบนจานอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไว้ 24 ชั่วโมงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* นำไปวางในแนวตรงข้ามกับรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG) (สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และสมบัติ ศรีชูวงศ์, 2546) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R_1-R_2)}{R_1} \times 100$$



กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีทดสอบ

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

ภาพที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture

6.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 6.2.3 โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ มาขีดบนจานอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไว้ 24 ชั่วโมงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* นำไปวางในแนวตรงข้ามกับรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสูตรคำนวณในข้อ 6.2.3

6.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 6.2.3 โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาขีดบนจานอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไว้ 24 ชั่วโมงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นำไปวางในแนวตรงข้ามกับรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสูตรคำนวณในข้อ 6.2.3

6.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cercospora capsici*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capcisi* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริก เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 6.2.3 โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาขีดบนจานอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไว้ 24 ชั่วโมงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *Cer. capsici* นำไปวางในแนวตรงข้ามกับรอยขีดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสูตรคำนวณในข้อ 6.2.3

7. การจำแนกชนิดเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์

7.1 การจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟท์

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยการดูจากรูปร่าง ขนาด สีของสปอร์และลักษณะโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้นบนอาหาร เช่น conidiophore, conidia และ fruiting body เป็นต้น โดยจะจำแนกถึงระดับ species โดยเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิงใน The Coelomycete (Sutton, 1980) Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis, 1971) More Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis, 1976) Genera of Hyphomycetes (Carmichael *et al*., 1980) และ Illustrated Genera of Ascomycetes Vol. 2 (Hanlin, 1998) เป็นต้น

7.2 การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ปฏิปักษ์ จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า โรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกโดยการส่งเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไปจำแนกชนิดที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

8.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ปฏิปักษ์ จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* และ *Cer. capsici* โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหาร NA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำเกลือฆ่าเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5

8.2 วิธีการทดสอบ

ทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ปฏิปักษ์ ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยใช้ cotton swab ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 1 และเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร MHA อย่างสม่ำเสมอ นำแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนผิวหน้าอาหาร MHA จำนวน 3 ชิ้นต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ หยดแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน disc บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ สังเกตการเกิดหรือไม่เกิดวงใสระหว่างเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งการทดสอบความเข้ากันได้ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทำ ดังนี้

แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 1 และ แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 2
แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 2 และ แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 3
แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 3 และ แบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 1

9. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการลดการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า

9.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. capsici* ด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหาร นับสปอร์ด้วย haemacytometer และปรับระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

9.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 3 และสายพันธุ์ที่ 2+3 (สายพันธุ์ที่ 2 ผสม สายพันธุ์ที่ 3 ในอัตราส่วน 1:1) ซึ่งคัดเลือกได้รวมทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติม 0.85% NaCl ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 และเติมสารยึดเกาะ sodium carboxy methylcellulose 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (อมรรัตน์ ชุมทอง , 2547) สำหรับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่นำมาผสมกันนั้น แต่ละเชื้อให้เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำมาผสมกันโดยแต่ละเชื้อให้ใช้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของเชื้อที่ใช้เดี่ยวๆ

9.3 วิธีการทดสอบ

จากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เตรียมไว้ในข้อ 9.2 จำนวน 3 สายพันธุ์ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าด้วยวิธี standard blotter plate โดยทำการปลูกเชื้อรา *C. capsici* บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า ด้วยการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl เป็นเวลา 2 นาที ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. capsici* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มในกล่องพลาสติกชื้น เป็นเวลา 2 วัน นำเมล็ดพริกชี้ฟ้าที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *C. capsici* แช่ในแบคทีเรียแขวนลอยทั้ง 3 สายพันธุ์ คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที นำเมล็ดพริกชี้ฟ้า จำนวน 25 เมล็ด วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสง

near ultra violet เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆ ละ 25 เมล็ด

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 3

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 2+3

กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดพริกในคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้น 1,600 mg/L

ทำการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้าหลังทำการปลูกเชื้อรา *C. capsici* เป็นเวลา 9 วัน โดยนับจำนวน acervulus ที่เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular และให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคแอนแทรคโนสดังนี้

ระดับ 0 : ไม่พบการเจริญของ acervulus บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า

ระดับ 1 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 1-5 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 2 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 6-10 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 3 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 11-15 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 4 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 16-20 acervuli ต่อเมล็ด

ระดับ 5 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้ามากกว่า 21 acervuli ต่อเมล็ด

นำค่าระดับความรุนแรงที่ประเมินได้ไปคำนวณหาค่าดัชนีการเกิดโรคและการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส (พราวมาส เจริญรักษ์ และคณะ, 2548) จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดพริกชี้ฟ้า} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค} = 100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

10. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

10.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ จำนวน 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 1+2) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland standard เบอร์ 0.5 และเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพ (Absa 80) จำนวน 0.4 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สองสายพันธุ์ผสมกัน เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 9.2

10.2 การเตรียมพืช

เตรียมต้นพริกชี้ฟ้าพันธุ์พริกหนุ่มเขียวลูกผสม จอมทอง 2 อายุ 2 เดือน โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88% NaOCl เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์เบนดาซิม (1,600 mg/L) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที เพาะเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าในกระบะเพาะย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ลงในถุงพลาสติกดำขนาด 8x16 นิ้ว สำหรับต้นกล้าพริกชี้ฟ้าที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ย้ายปลูกต้นกล้าถุงละ 1 ต้น รวมทั้งหมด 100 ต้น ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่า ย้ายปลูกต้นกล้าถุงละ 4 ต้น รวมทั้งหมด 400 ต้น โดยวางถุงเป็นแถวเดี่ยวในแปลงทดลอง ระยะห่างระหว่างถุงในแถว 0.7 เมตร ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ทุก 7 วัน ในอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และเมื่อเริ่มเก็บเกี่ยวใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ผสมกับ 13-13-21 (อัตรา 1:1) ทุก 5 วัน (นิรนาม, 2550)

10.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคตามธรรมชาติ (natural infection) เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อต้น ฉีดพ่นทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1+2

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้น 1,600 mg/L

ประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนส เมื่อเสร็จสิ้นการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าตามกรรมวิธีข้างต้น ด้วยวิธี descriptive area กับผลพริกชี้ฟ้าทั้งต้น โดยให้ระดับความรุนแรงดังนี้ (ดัดแปลงจาก จิรัสสา มีกลิ่นหอม, 2547)

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส

ระดับ 1 : แสดงอาการโรค 1-25 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (1 แผลต่อผล)

ระดับ 2 : แสดงอาการโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (2 แผลต่อผล)

ระดับ 3 : แสดงอาการโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (3 แผลต่อผล)

ระดับ 4 : แสดงอาการโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (4 แผลต่อผล)

ประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า เมื่อเสร็จสิ้นการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าตามกรรมวิธีข้างต้น ด้วยวิธี descriptive area กับใบพริกชี้ฟ้าทั้งต้น โดยให้ระดับความรุนแรงดังนี้

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการ

ระดับ 1 : แสดงอาการโรค 1-25 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (1-2 แผลต่อใบ)

ระดับ 2 : แสดงอาการโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (3-4 แผลต่อใบ)

ระดับ 3 : แสดงอาการโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (5-6 แผลต่อใบ)

ระดับ 4 : แสดงอาการโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (มากกว่า 6 แผลต่อใบ)

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค มาคำนวณค่าดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค (พราวมาส เจริญรักษ์ และคณะ, 2548) จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x 100}}{\text{จำนวนต้น x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ x 100}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

10.4 การทดสอบประสิทธภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

10.4.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริก โดยเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3.3 บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญอยู่บนผิวหน้าให้มีขนาด 2x2 เซนติเมตร และทำการปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* อัตราส่วน ดังนี้ คลุกเส้นใยเชื้อราอัตราส่วน 5 กรัมต่อถุง พร้อมกับย้ายต้นกล้าปลูก เมื่อต้นพริกมีอายุได้ 2 เดือนและ 3 เดือนหลังย้ายปลูก คลุกเส้นใยเชื้อราบริเวณรอบโคนต้นพริก อัตราส่วน 15 กรัมต่อต้น

10.4.2 การทดสอบ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน โดยราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์บอกซินและน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อต้น ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 2 เดือน ตรวจผลโดยการนับจำนวนต้นพริกที่เหี่ยวและต้นตายทุก 14 วัน จนเก็บผลผลิต วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 80 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 ราดดินด้วยน้ำกลั่น

กรรมวิธี่ที่ 2 ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธี่ที่ 3 ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธี่ที่ 4 ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย สายพันธุ์ที่ 1+2

กรรมวิธีที่ 5 ราดดินด้วยคาร์บอกซิน ที่ระดับความเข้มข้น 375 mg/L

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพริก

เก็บตัวอย่างต้นพริกที่ไม่เป็นโรค เพื่อนำมาแยกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นพริกในพื้นที่จังหวัดชุมพร ระนอง นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และสงขลา เก็บตัวอย่างต้นพริกระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2551 เพื่อนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ และเก็บตัวอย่างต้นพริกระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึง มกราคม พ.ศ. 2553 เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างต้นพริกจากแหล่งปลูกพริกเพื่อมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้จำนวน 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างเพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 14 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ เช่นกัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างพริกและจำนวนตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างแยกเชื้อราเอนโดไฟท์	จำนวนตัวอย่างแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์
จ. ชุมพร		
อ. เมือง	2	-
อ. สวี	1	-
จ. ระนอง		
อ. เมือง	3	-
อ. ละอุ่น	3	-
จ. นครศรีธรรมราช		
อ. เชียรใหญ่	-	1
อ. ปากพนัง	-	2
อ. หัวไทร	-	3
จ. สุราษฎร์ธานี		
อ. กาญจนดิษฐ์	-	3
อ. ท่าชนะ	1	-
อ. เมือง	-	2
จ. สงขลา		
อ. คลองหอยโข่ง	2	2
อ. หาดใหญ่	2	1
รวม	14	14

2. การแยกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

2.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพริก

จากการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นพริก จากบริเวณพื้นที่ อ. เมือง และ อ. สวี จ.ชุมพร อ. เมือง และ อ. ละอุ่น จ. ระนอง อ. ท่าชนะ จ. สุราษฎร์ธานี อ. คลองหอยโข่ง และ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา โดยแยกจากส่วน ใบ กิ่ง และราก จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมา (Isolate prevalence) พบว่า ส่วนของใบ มีจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมามากที่สุด คือ 100% รองลงมาคือส่วนของกิ่ง มีจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาคิดเป็น 95% และส่วนของรากมีจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาน้อยที่สุดคิดเป็น 38.57% (ตารางที่ 4) และจากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช ซึ่งเลือกเก็บเชื้อราที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 146 ไอโซเลท ส่วนของพริกที่พบจำนวนของเชื้อรามากที่สุด คือ ส่วนใบซึ่งสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 57 ไอโซเลท (ตารางที่ 5)

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

สำหรับการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นพริก จากบริเวณพื้นที่ อ. เชียรใหญ่ อ.ปากพนัง และ อ. หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช อ. กาญจนดิษฐ์ และ อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี อ. คลองหอยโข่ง และ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา โดยแยกจากส่วน ใบ ก้านใบ กิ่ง และราก จากการแยกเชื้อพบว่า ส่วนของราก มีจำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มากที่สุดคิดเป็น 35.12% รองลงมาคือส่วนของก้านใบ มีจำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์คิดเป็น 23.41% (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lamp และคณะ (1996) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Pseudomonas aureofaciens* จากพืช 16 ชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี และบล็อคโคลี เป็นต้น พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้จากเนื้อเยื่อส่วนรากของพืชได้มากที่สุด และปริมาณเชื้อน้อยลงในลำต้นและใบ และจากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ซึ่งเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 205 ไอโซเลท

จำนวนไอโซเลทของเชื้อทั้งเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สายพันธุ์พืช เนื้อเยื่อพืชที่นำมาแยกตัวอย่างเชื้อ ระยะการเจริญของพืช สภาวะแวดล้อมที่พืชเจริญ ความหลากหลายของเชื้อที่พบในเนื้อเยื่อพืชนั้นอาจจะเป็นผลมาจากความสามารถเฉพาะของเชื้อที่มีความแตกต่างกันที่จะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชได้ โดยทั่วไปสามารถพบเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ปริมาณสูงสุดในเนื้อเยื่อรากพืช ปริมาณเชื้อในลำต้นและใบจะลดน้อยลง ส่วนที่พบน้อยที่สุดหรือในบางครั้งอาจจะ

ไม่พบเชื้อเอนโดไฟท์เลยในส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่เจริญเป็นดอก ผล และเมล็ด (Quadt-Hallmann and Kloepper, 1996; Hallmann *et al*., 1997) เชื้อราก็เช่นเดียวกันสามารถพบเชื้อราเอนโดไฟท์ปริมาณสูงสุดในเนื้อเยื่อราก (Kim *et al*., 2007; Naik *et al*., 2009) ซึ่งเหตุผลที่ทำให้พบจำนวนของเชื้อเอนโดไฟท์ในส่วนรากมากกว่าบริเวณอื่นนั้นอาจจะเนื่องมาจากบริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวมีความอุดมสมบูรณ์ของอาหารและสภาพแวดล้อม ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อพืชที่อยู่เหนือดินนั้นอาจจะมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมน้อยกว่าในเรื่องของอุณหภูมิ น้ำ สารอาหาร และผลของรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

ตารางที่ 4 ค่า Isolate prevalence ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นพริก

ตัวอย่างต้นพริก	**จำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญออกมา (เปอร์เซ็นต์)**			**Isolate prevalence (%)**
	ใบ	**กิ่ง**	**ราก**	
1. HSo1	100	100	10	70.00
2. HSo2	100	80	60	80.00
3. KSo1	100	80	0	60.00
4. KSo2	100	100	50	83.33
5. TSu1	100	90	70	86.66
6. MCh1	100	100	30	76.66
7. MCh2	100	90	50	80.00
8. SCh1	100	100	50	83.33
9. MRa1	100	100	70	90.00
10. MRa2	100	100	60	86.66
11. MRa3	100	100	10	70.00
12. LRa1	100	90	10	66.66
13. LRa2	100	100	20	73.33
14. LRa3	100	100	50	83.33
เฉลี่ย	100	95	38.57	76.19

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบ กิ่งและรากของต้นพริก

ตัวอย่างต้นพริก	จำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์			รวม
	ใบ	กิ่ง	ราก	
1. HSo1	5	6	1	12
2. HSo2	6	4	3	13
3. KSo1	6	2	0	8
4. KSo2	2	3	2	7
5. TSu1	4	5	3	12
6. MCh1	5	4	1	10
7. MCh2	5	2	4	11
8. SCh1	3	4	5	12
9. MRa1	3	3	7	13
10. MRa2	2	2	3	7
11. MRa3	2	3	1	6
12. LRa1	6	6	1	13
13. LRa2	3	6	1	10
14. LRa3	5	4	3	12
รวม	57	54	35	146
%	39.04	36.99	23.97	

ตารางที่ 6 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบ ก้านใบ กิ่งและราก ของต้นพริก

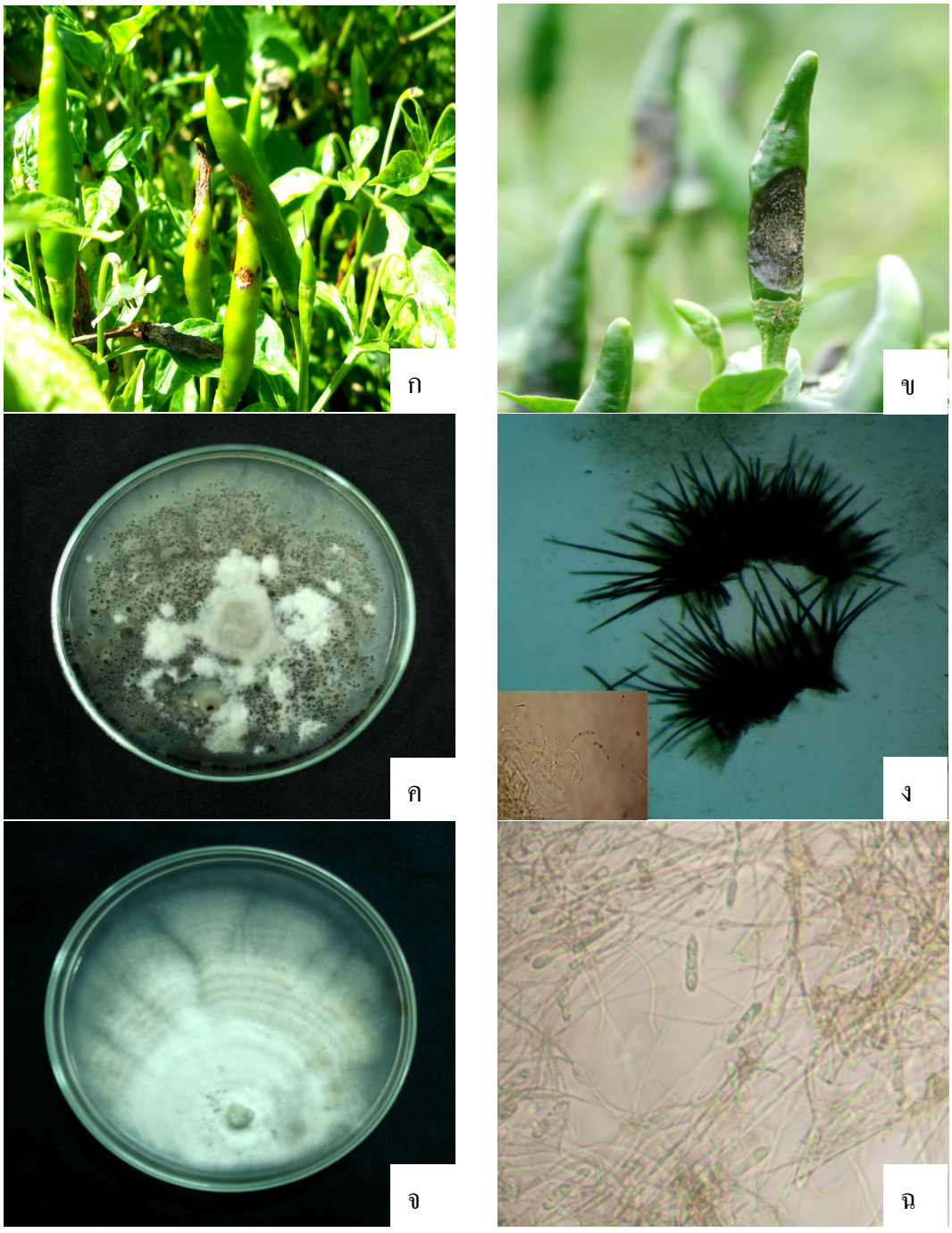
ตัวอย่าง ต้นพริก	จำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์				รวม
	ใบ	ก้านใบ	กิ่ง	ราก	
1. BHSo1	3	3	2	9	17
2. BKSo1	5	6	7	3	21
3. BKSo2	5	5	3	4	17
4. BPNa1	2	3	3	5	13
5. BPNa2	2	3	2	3	10
6. BCNa1	1	1	1	4	7
7.BHuNa1	2	3	3	3	11
8. BHuNa2	2	2	2	3	9
9. BHuNa3	4	3	3	5	15
10. BMSu1	5	4	3	9	21
11. BMSu2	4	3	4	4	15
12. BKaSu1	2	3	1	6	12
13. BKaSu2	4	4	4	5	17
14. BKaSu3	3	5	3	9	20
รวม	44	48	41	72	205
%	21.46	23.41	20.00	35.12	

3. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า

3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส เพื่อนำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสงขลา ได้จำนวน 6 ตัวอย่าง จากตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส จำนวน 6 ตัวอย่าง สามารถแบ่งลักษณะอาการของโรคได้ 2 กลุ่ม คือ แผลบนผลพริกมีลักษณะกลมหรือรูปร่างไม่แน่นอน แผลยุบลง มีสีน้ำตาล บริเวณกลางแผลพบการสร้าง acervulus สีดำ และพบกลุ่มโคนิเดียสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 3) สามารถเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง และกลุ่มลักษณะแผลยาวรี แผลยุบตัวลง บริเวณกลางแผลพบกลุ่มโคนิเดียสีส้ม พบลักษณะอาการเช่นนี้จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) ได้รายงานไว้ว่าลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่บริเวณกลางแผลพบการสร้าง setae ภายใน acervulus และมีกลุ่มโคนิเดียสีน้ำตาลดำ เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* ส่วนลักษณะอาการของโรคที่กลางแผลพบกลุ่มกลุ่มโคนิเดียสีส้ม แต่ไม่พบการสร้าง setae ภายใน acervulus เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการของโรคจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยนำผลพริกที่มีลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสทั้ง 2 ลักษณะอาการ มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยวิธี single spore isolation โดยการเขี่ยโคนิเดียเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางเลี้ยงบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราเจริญทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Sutton (1992) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides*



ภาพที่ 3 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

(ก)-(ข) ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่ปรากฏบนผลพริก

(ค) โคโลนีเชื้อรา *C. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 18 วัน

(ง) acervulus, setae และโคนิเดียของเชื้อรา *C. capsici* (40 เท่า)

(จ) โคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 18 วัน

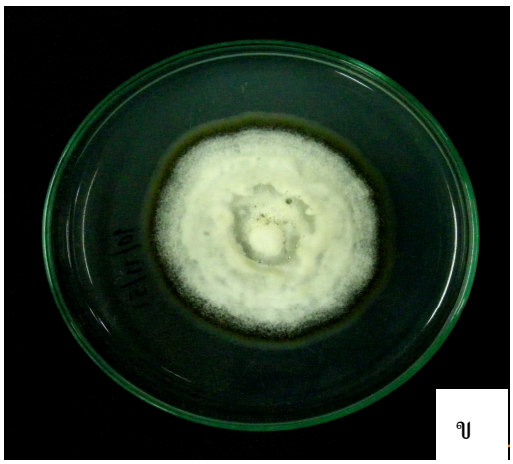
(ฉ) โคนิเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (40 เท่า)

3.2 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

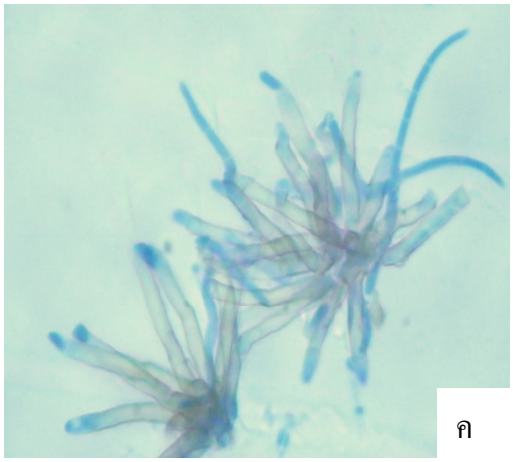
เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอราภายในพื้นที่จังหวัดสงขลา โดยโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกมีเหตุจากเชื้อรา *Cercospora capsici* ซึ่งเชื้อรา *Cer. capcisi* สามารถเข้าทำลายใบ ลำต้น และก้านผล แผลมีลักษณะกลม สีน้ำตาลดำ ขนาด 3-4 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อกลางแผลแห้ง บาง มีสีขาวหรือสีเทา กลางแผลมีราสีเทาดำขึ้นเป็นกระจุก เนื้อเยื่อรอบแผลมีสีเหลือง (ภาพที่ 4) ซึ่งจากลักษณะอาการดังกล่าวสามารถเก็บตัวอย่างโรคใบจุดเซอร์คอสปอราได้จำนวน 10 ตัวอย่าง

เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ซึ่งบ่มตัวอย่างใบพริกโดยวิธี standard blotter plate และทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี single spore isolation วางบนอาหาร PDA พบว่าได้เชื้อราที่มีเส้นใยสีเทา เส้นใยของเชื้อรามีผนังกั้น มีการสร้างสี (pigment) ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4) เมื่อทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Ellis (1971) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *Cer. capsici*

ก



ข



ค

ภาพที่ 4 เชื้อรา *Cercospora capsici* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

(ก) ลักษณะอาการของโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่ปรากฏบนใบพริก

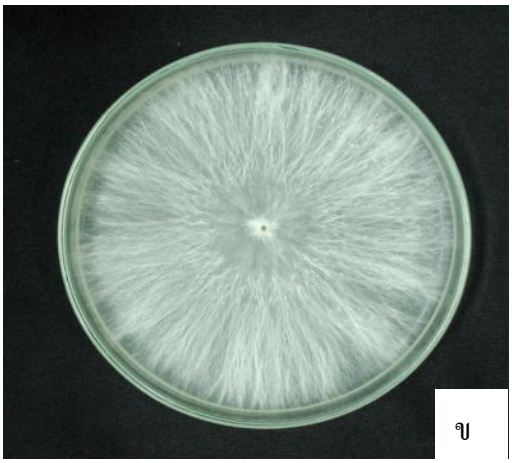
(ข) โคโลนีเชื้อรา *Cer. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 27 วัน

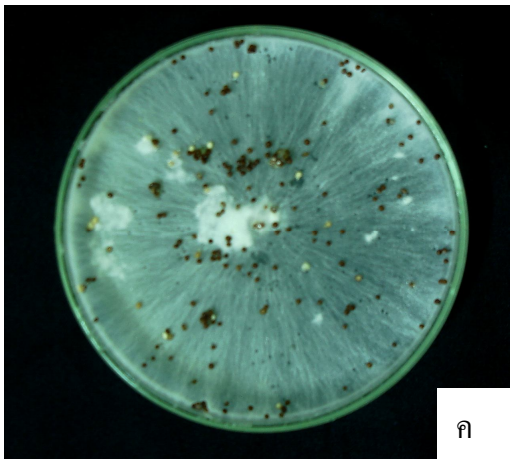
(ค) โคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียของเชื้อรา *Cer. capsici* (40 เท่า)

3.3 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า

เก็บตัวอย่างต้นพริกที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่า เพื่อนำมาแยกเชื้อรา *S. rolfsii* โดยทำการเก็บตัวอย่างโรคในพื้นที่จังหวัดสงขลา โดยสามารถเก็บตัวอย่างโรคได้จำนวน 6 ตัวอย่าง ลักษณะอาการของต้นพริกที่แสดงอาการของโรครากและโคนเน่า พบอาการโคนต้นปริแตก แผลยุบตัวลง เนื้อเยื่อใต้เปลือกมีสีน้ำตาลดำ มีเส้นใยราสีขาวปกคลุมโคนต้น พบเม็ดสเคลอโรเทียมเกาะอยู่ตามโคนและราก ใบเหลือง ร่วง และยืนต้นตาย (ภาพที่ 5)

เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวเม็ดสเคลอโรเทียมด้วย 0.88% NaOCl วางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เชื้อที่ได้มีเส้นใยสีขาวหยาบ เส้นใยมีผนังกั้น สร้างเม็ดสเคลอโรเทียมอัดตัวแน่นสีน้ำตาล ซึ่งเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 4 วัน (ภาพที่ 5) และเมื่อทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Punja (1985) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *S. rolfsii*





ภาพที่ 5 เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

(ก) เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* บริเวณโคนต้นพริก

(ข) โคโลนีเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA อายุ 4 วัน

(ค) เชื้อรา *S. rolfsii* สร้างเม็ดสเคลอโรเทียม เมื่ออายุ 10 วัน

4. การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค

4.1 การพิสูจน์โรคแอนแทรคโนส

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่แยกได้จากข้อ 3.1 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา วางชิ้นวุ้นบนผลพริกชี้ฟ้าปกติไม่แสดงอาการโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88 % NaOCl ทำแผลด้วยเข็มเขี่ย ทำการทดสอบไอโซเลทละ 4 ผล จากนั้นนำไปบ่มในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้อง หลังทำการปลูกเชื้อ 7 วันพบว่า ผลพริกที่ทำการปลูกเชื้อ *C. capsici* บนผลพริกมีแผลมีลักษณะกลม แผลยุบลง มีสีน้ำตาล บริเวณกลางพบกลุ่มโคนิเดียสีน้ำตาลดำ ส่วนบนผลพริกที่ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ลักษณะแผลยาวรี แผลยุบตัวลง บริเวณกลางแผลพบกลุ่มโคนิเดียสีส้ม (ภาพที่ 6) ทำการแยกเชื้อจากผลพริกดังกล่าวซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี single spore isolation พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อบนผลพริก ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคแอนแทรคโนส สำหรับเชื้อ *C. capsici* ซึ่งมีเพียง 1 สายพันธุ์ซึ่งเมื่อทำการปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคบนผลพริกดังนั้นจึงสามารถนำเชื้อ *C. capsici* สายพันธุ์ C1 ไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ ส่วนเชื้อ *C. gloeosporioides* คัดเลือกได้สายพันธุ์ C5

ภาพที่ 6 การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้า

(ก) เชื้อ *C. capsici* C1 ปลูกเชื้อบนผลพริกชี้ฟ้าเขียว

(ข) เชื้อ *C. capsici* C1 ปลูกเชื้อบนผลพริกชี้ฟ้าแดง

(ค) เชื้อ *C. gloeosporioides* C5 ปลูกเชื้อบนผลพริกชี้ฟ้าเขียว

(ง) เชื้อ *C. gloeosporioides* C5 ปลูกเชื้อบนผลพริกชี้ฟ้าแดง

4.2 การพิสูจน์โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่แยกได้จากข้อ 3.2 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำไปวางบนใบพริกที่ปกติและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88 % NaOCl ทำการปลูกเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยทำแผล จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีละอองน้ำพรมอยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 5 วัน พบว่าแผลมีลักษณะกลมสีน้ำตาลดำ เนื้อเยื่อกลางแผลแห้งบาง มีสีขาวหรือสีเทา กลางแผลมีราสีเทาดำขึ้นเป็นกระจุกและเนื้อเยื่อรอบแผลมีสีเหลือง และเมื่อทำการแยกเชื้อราจากใบพริกดังกล่าวซ้ำด้วยวิธี single spore isolation พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อบนใบพริก ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่ก่อโรคใบจุดเซอร์คอสปอรารุนแรงที่สุด จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ Ce7

4.3 การพิสูจน์โรครากและโคนเน่า

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าที่แยกได้จากข้อ 3.3 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำชิ้นวุ้นไปวางบริเวณโคนต้นพริก อายุ 2 เดือน ใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน โดยต้นพริกมีลักษณะอาการเปลือกยุบตัวลง มีเส้นใยราสีขาวปกคลุม ในวันที่ 12 หลังทำการปลูกเชื้อ พบว่าเชื้อสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมสีน้ำตาลกลมเกาะบริเวณโคนต้นพริก โคนต้นเน่าเปื่อยเป็นสีน้ำตาลดำและต้นพริกหักพับตาย (ภาพที่ 7) ทำการแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้งโดยนำเม็ดสเคลอโรเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.88 % NaOCl วางเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรครากและโคนเน่า จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ S5

ภาพที่ 7 ลักษณะอาการของโรครากและโคนเน่าที่ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* S5 เพื่อพิสูจน์โรคบนต้นพริกชี้ฟ้า

5. การทดสอบความรุนแรงของรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อเป็นโรคของพริก

5.1 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนผลพริก

ผลการทดลองพบว่าโดยทั่วไปเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบและกิ่งของต้นพริกปกติ (ไอโซเลท End 1-6) มีความรุนแรงในการก่อโรคบนผลพริกน้อยกว่าเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อผลพริกที่เป็นโรค (ไอโซเลท Path1-6) เชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท End 1-4 ไม่สามารถก่อโรคบนผลพริกสีเขียวได้ ขณะที่ไอโซเลท End 5 สามารถทำให้เกิดโรคกับผลพริกสีเขียวได้เล็กน้อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 20% และมีระดับความรุนแรงเท่ากับ 1 (ตารางที่ 7) แต่ในผลพริกสุกสีแดง เชื้อไอโซเลท End 2-6 ทำให้เกิดโรคประมาณ 60-100% และมีความรุนแรงอยู่ที่ระดับ 1-4 อาจเนื่องจากผลพริกสีแดงสุกแก่ ความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อจึงน้อย เป็นที่น่าสังเกตว่าไอโซเลท End 1 ไม่สามารถเข้าทำลายทั้งผลพริกสีเขียวและสีแดง อาจเป็นไอโซเลทที่ไม่ก่อโรคกับพริก *C. capsici* ไอโซเลท End 6 ก็ให้ผลในแนวทางเดียวกันคือไม่สามารถเข้าทำลายผลพริกสีเขียว แต่ทำลายผลแก่สีแดงได้

เชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเป็นโรค (ไอโซเลท Path 1-6) สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าไอโซเลท End 1-6 ทั้งบนผลพริกสีเขียวและสีแดง โดย *C. gloeosporioides* จำนวน 3 ไอโซเลท ทำให้มีอัตราการเกิดโรคถึง 100% ซึ่งรุนแรงกว่า *C. capsici* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Charigkapakorn (2000) ที่รายงานว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* เข้าทำลายผลพริกสีเขียวมากกว่า แต่ *C. capsici* เข้าทำลายผลพริกสีแดงโดยเฉพาะผลพริกหลังเก็บเกี่ยวมากกว่า ในผลพริกสีแดงเชื้อทั้งสองชนิดทำให้เกิดโรคได้ 80-100% และมีระดับความรุนแรง 2-4 (ตารางที่ 7, ภาพที่ 8)

ตารางที่ 7 อัตราการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนผลพริกหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นเวลา 7 วัน

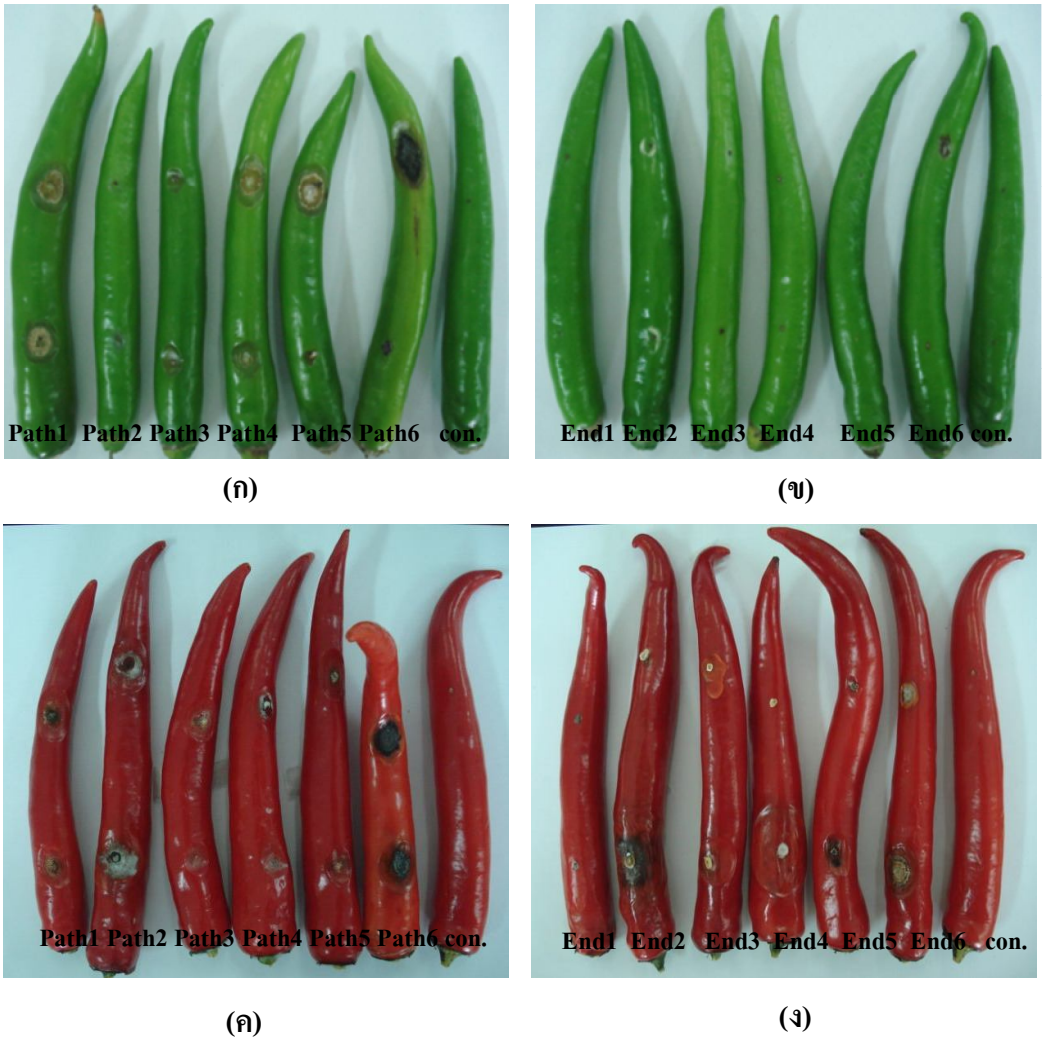
ไอโซเลท	อัตราการเกิดโรค (%)[1/]		ความรุนแรง[2/]	
	ผลพริกแก่ สีเขียว	ผลพริกสุก สีแดง	ผลพริกแก่ สีเขียว	ผลพริกสุก สีแดง
C. gloeosporioides End 1	0	0	0a[3/]	0a
C. gloeosporioides End 2	0	60	0a	3d
C. gloeosporioides End 3	0	60	0a	1b
C. gloeosporioides End 4	0	60	0a	4e
C. gloeosporioides End 5	20	100	1b	2c
C. capsici End 6	0	80	0a	1b
เฉลี่ย	3.33	60	0.17a	1.83c
C. gloeosporioides Path 1	100	100	2c	3d
C. gloeosporioides Path 2	0	80	0a	4e
C. gloeosporioides Path 3	100	100	1b	2c
C. gloeosporioides Path 4	100	100	1b	2c
C. gloeosporioides Path 5	100	100	1b	3d
C. capsici Path 6	20	100	1b	3d
เฉลี่ย	70	96.67	1b	2.83d
Control (PDA disc)	0	0	0a	0a

[1/]อัตราการเกิดโรค (Disease incident) = $\frac{\text{จำนวนผลพริกที่แสดงอาการของโรค}}{\text{จำนวนผลพริกทั้งหมดที่ทดสอบ}}$ x100

[2/]ความรุนแรง (Disease severity) = พื้นที่บนผลพริกที่แสดงอาการของโรค

0 = ไม่ปรากฏอาการของโรค
1 = 0-100 ตารางมิลลิเมตร
2 = 101-200 ตารางมิลลิเมตร
3 = 201-300 ตารางมิลลิเมตร
4 = มากกว่า 301 ตารางมิลลิเมตร

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



(ก) **(ข)**

(ค) **(ง)**

ภาพที่ 8 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

(ก) ผลพริกชี้ฟ้าเขียวปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท Path1-6)

(ข) ผลพริกชี้ฟ้าเขียวปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท End1-6)

(ค) ผลพริกชี้ฟ้าแดงปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท Path1-6)

(ง) ผลพริกชี้ฟ้าแดงปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท End1-6)

5.2 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนเมล็ดพริก

จากการทำ blotter plate เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับเมล็ดพริกของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบและกิ่งของต้นพริกปกติ (ไอโซเลท End 1-6) เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อผลพริกที่เป็นโรค (ไอโซเลท Path 1-6) ซึ่งทำการนับจำนวน acervulus บนเมล็ดพริกในวันที่ 9 หลังการปลูกเชื้อ จากการทดลองพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิด *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้ และเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกจากต้นพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส เชื้อทุกไอโซเลทสามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้ พบว่าเชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท Path 6 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท End 6 และเชื้อ *C. capsici* ทั้งไอโซเลท Path 6 และ End 6 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ส่วนความสามารถในการสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกของเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท End 1-5 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Path 1-5 (ตารางที่ 8, ภาพที่ 9)

ตารางที่ 8 ความรุนแรงของโรคบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °C) เป็นเวลา 9 วัน

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย acervuli บนเมล็ดพริก[1/]	ความรุนแรง[2/]
C. gloeosporioides End 1	12.94d[3/]	3
C. gloeosporioides End 2	7.51c	2
C. gloeosporioides End 3	3.33b	1
C. gloeosporioides End 4	0.42a	1
C. gloeosporioides End 5	0.19a	1
C. capsici End 6	13.49d	3
เฉลี่ย	6.31c	1.83
C. gloeosporioides Path 1	0.76a	1
C. gloeosporioides Path 2	0.17a	1
C. gloeosporioides Path 3	0.89a	1
C. gloeosporioides Path 4	0.54a	1
C. gloeosporioides Path 5	0.03a	1
C. capsici Path 6	17.05e	4
เฉลี่ย	3.24b	1.50
Control (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	0a	0

[1/] ค่าเฉลี่ย acervuli บนเมล็ดพริก 100 เมล็ด

[2/] ความรุนแรง (Disease severity)

0 = ไม่ปรากฏอาการของโรค

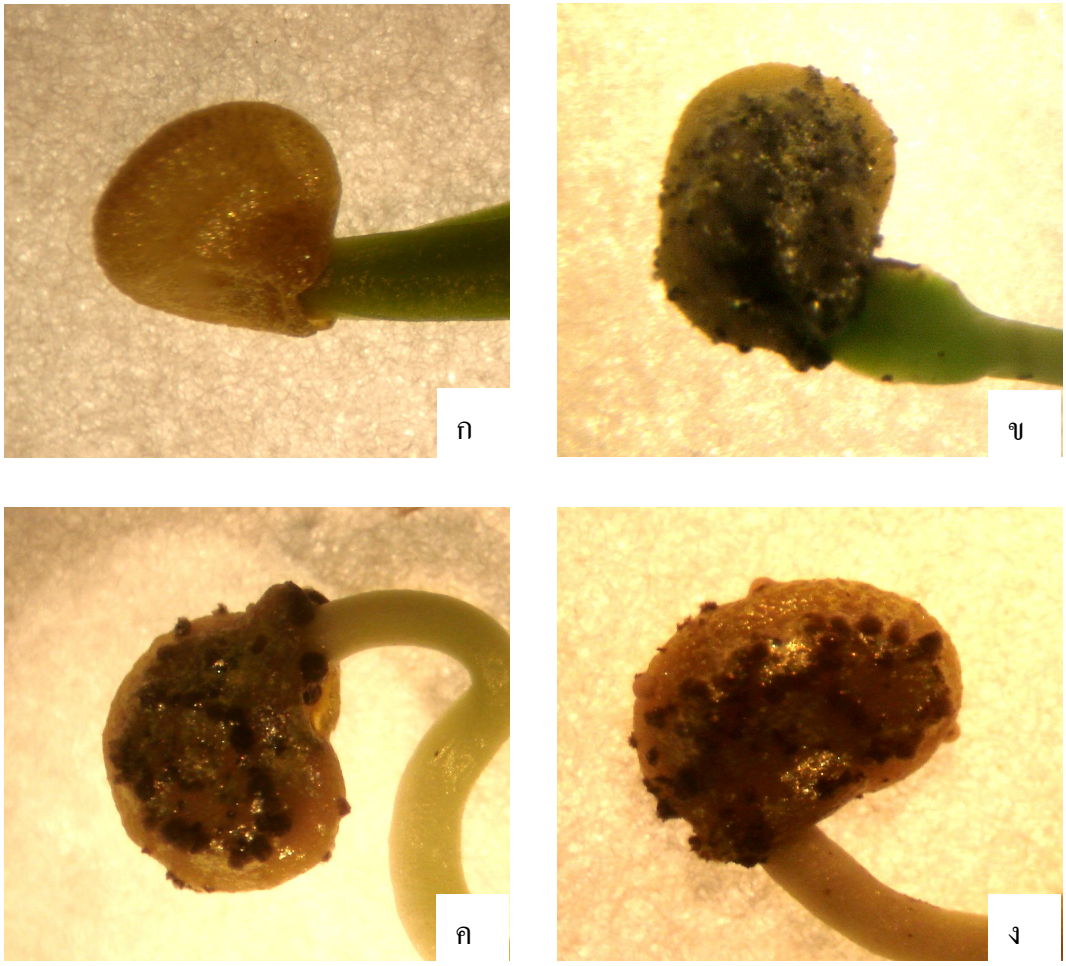
1 = 0.01-5 acervuli ต่อเมล็ด

2 = 6-10 acervuli ต่อเมล็ด

3 = 11-15 acervuli ต่อเมล็ด

4 = 16 acervuli หรือมากกว่า 16 acervuli ต่อเมล็ด

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



ภาพที่ 9 ความรุนแรงของรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อปกติและเป็นโรคของพริกบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) เชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท End 6

(ค) เชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท End 2

(ง) เชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท Path 6

5.3 การทดสอบความรุนแรงของ *Colletotrichum* spp. บนต้นพริกชี้ฟ้า

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นพริกของเชื้อราชนิด *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท End 1-6) เปรียบเทียบกับเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท Path 1-6) ซึ่งทำการปลูกเชื้อโดยการพ่น spore suspension ความเข้มเข้ม 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นพริกอายุ 3 สัปดาห์ และทำการวัดระดับการเกิดโรคในวันที่ 7 หลังการปลูกเชื้อ พบว่าเมื่อทำการวัดระดับการเกิดโรคพบอาการแผลจุดขนาดเล็ก แผลไหม้ สีน้ำตาล ใบเหลือง และใบร่วง ซึ่งในการวัดระดับการเกิดโรคพบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถทำให้ต้นพริกแสดงอาการของโรค เมื่อทำการประเมินระดับการเกิดโรคโดยเฉลี่ย พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท Path 1-6) มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในระดับที่สูงกว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท End 1-6) (ตารางที่ 9, ภาพที่ 10)

จากการ re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 และเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 ที่ทำการปลูกเชื้อลงบนต้นพริกโดยการแยกเชื้อจากใบพริกที่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งทำการแยกเชื้อจากส่วนของใบและก้านใบ พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 ทุกไอโซเลท สามารถทำการ re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้ ซึ่งในส่วนของใบสามารถแยกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้ทุกไอโซเลท สำหรับในก้านใบเชื้อไอโซเลท End 1 และ End 5 ไม่สามารถ re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้ และพบว่าสามารถทำการ re-isolate เชื้อจากส่วนของใบได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าก้านใบทุกไอโซเลท และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง *C. capsici* (ไอโซเลท End 6) และเชื้อ *C. gloeosporioides* (ไอโซเลท End 1-5) พบว่าสามารถทำการแยกเชื้อ *Colletotrichum capsici* ได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าทั้งในส่วนที่แยกจากก้านใบและใบ คือ สามารถ re-isolate เชื้อ *C capsici* ได้ 90% และ 100% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *C. gloeosporioides* สามารถ re-isolate เชื้อจากส่วนของใบได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุดจากไอโซเลท End 4 คือ 80% และก้านใบสามารถ re-isolate เชื้อจาก ไอโซเลท End 3 ได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุด คือ 55% และสำหรับเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 พบว่า ไอโซเลท Path 2-6 สามารถ re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ได้ ยกเว้นไอโซเลท Path 1 ไม่สามารถ re-isolate เชื้อได้ทั้งในส่วนของใบและก้านใบ ทั้งนี้พบว่าสามารถ re-isolate เชื้อจากส่วนของใบได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าก้านใบทุกไอโซเลทและสามารถ re-isolate เชื้อ *C. capsici* (Path 6) ได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* (Path 1-5) คือ สามารถ re-isolate เชื้อ *C. capsici* (Path 6) จากส่วนของใบและก้านใบได้ 80% และ 60% ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *C. gloeosporioides* สามารถ re-isolate ได้เปอร์เซ็นต์สูงที่สุดจากไอโซเลท Path 2 สามารถ re-isolate เชื้อจากใบและก้านใบได้ 50% และ 10% ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าสามารถ

re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 ได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. (Path 1-6) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* พบว่าสามารถ re-isolate เชื้อ *C. capsici* ได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า (ตารางที่ 9, ภาพที่ 11)

เชื้อรา *Colletotrichum* บางชนิดนอกจากทำให้เกิดโรคกับพืชแล้ว พบว่าเชื้อรายังสามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งอยู่ในระยะแฝง (latent infection) ซึ่งไม่เกิดการพัฒนาของโรคจนกว่าพืชจะอยู่ในช่วงที่อ่อนแอ (Jeffries *et al*., 1990) และเชื้อยังสามารถเจริญแบบเอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อพืชปกติได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค เชื้อรา *Colletotrichum* หลายชนิดสามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อพืชปกติ (Rodrigues and Petrini, 1997) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* มีพัฒนาการมาจากเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในระยะแฝงหรือเชื้อเหล่านี้สูญเสียความรุนแรงในการก่อโรค ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อรา *Colletotrichum* เป็นเชื้อก่อโรคที่สร้างความเสียหายให้กับพืช แต่ก็สามารถพบเชื้อรา *Colletotrichum* เป็นเชื้อเอนโดไฟท์ของพืชในเขตร้อน (Rodrigues and Petrini,1997) ซึ่ง *Colletotrichum* ที่เป็นเชื้อแฝงมีรายงานพบในพืชหลายชนิด (Cerkauskas and Sinclar, 1980; Hartman *et al*., 1986) และพบในผลผลิตที่ยังเป็นผลสีเขียว (Brown, 1975; Muirhead and Deverall, 1981; Daykin and Milholland, 1984) ประเด็นที่สำคัญหากเกิดการติดเชื้อแฝงและไม่มีการตวจสอบการติดเชื้อแฝงก็อาจนำไปสู่การติดเชื้อของพืชปลูกสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตหากปลูกเป็นเชิงพาณิชย์ได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง จากรายงานของ Eckert และ Ogawa (1985) พบว่า ในประเทศที่มีความเจริญของเทคโนโลยีทางการเกษตรในระดับที่ไม่สูงมากนัก ความเสียหายของพืชที่ติดเชื้อแฝงซึ่งเกิดความเสียหายกับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว อาจเกิดความเสียหายถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิต เชื้อราแฝงจะอยู่ในเนื้อเยื่อผลผลิตที่ยังไม่สุกและเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว พืชที่เก็บเกี่ยวมาจะเกิดโรคผลเน่าในภายหลัง

ตารางที่ 9 ความรุนแรงของโรคบนต้นพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End 1-6 และ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท Path 1-6 เป็นเวลา 7 วัน และจำนวนของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่ re-isolation จากเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นโรคของพืชที่ปลูกเชื้อ

ไอโซเลท	ความรุนแรง[1/]	ความถี่ของการ re-isolation เชื้อ [2/] (%)	
		ก้านใบ	ใบ
C. gloeosporioides End 1	1.25bc[3/]	0	20
C. gloeosporioides End 2	0.25a	35	65
C. gloeosporioides End 3	1.13b	55	65
C. gloeosporioides End 4	1.25bc	5	80
C. gloeosporioides End 5	1.50bcd	0	25
C. capsici End 6	1.13b	90	100
เฉลี่ย	1.08b	30.83	59.17
C. gloeosporioides Path 1	2.00d	0	0
C. gloeosporioides Path 2	1.13b	10	50
C. gloeosporioides Path 3	1.25bc	5	10
C. gloeosporioides Path 4	2.00d	10	15
C. gloeosporioides Path 5	1.63bcd	5	10
C. capsici Path 6	1.75cd	60	80
เฉลี่ย	1.63bcd	15	27.50
Control (water)	0a	0	0

[1/] ความรุนแรง (Disease severity)

0 = ไม่ปรากฏอาการของโรค

1 = 1-10 จุดแผลต่อต้นกล้า

2 = มากกว่า 10 จุดแผลต่อต้นกล้าและแสดงอาการใบไหม้

3 = แสดงอาการใบจุดรุนแรง, ใบไหม้, ใบเหลือง และใบร่วง 1 - 2 ใบต่อต้นกล้า

4 = แสดงอาการใบจุดรุนแรง, ใบไหม้, ใบเหลือง และใบร่วง 3 ใบ หรือมากกว่า 3 ใบต่อต้นกล้า

[2/] ความถี่ของการ re-isolation (%)

$$= \frac{\text{จำนวนของชิ้นใบหรือก้านใบที่เชื้อ } \textit{Colletotrichum} \text{ เจริญออกมา}}{\text{จำนวนชิ้นใบหรือก้านใบทั้งหมดที่ทำการทดสอบ}} \times 100$$

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

ก

ข

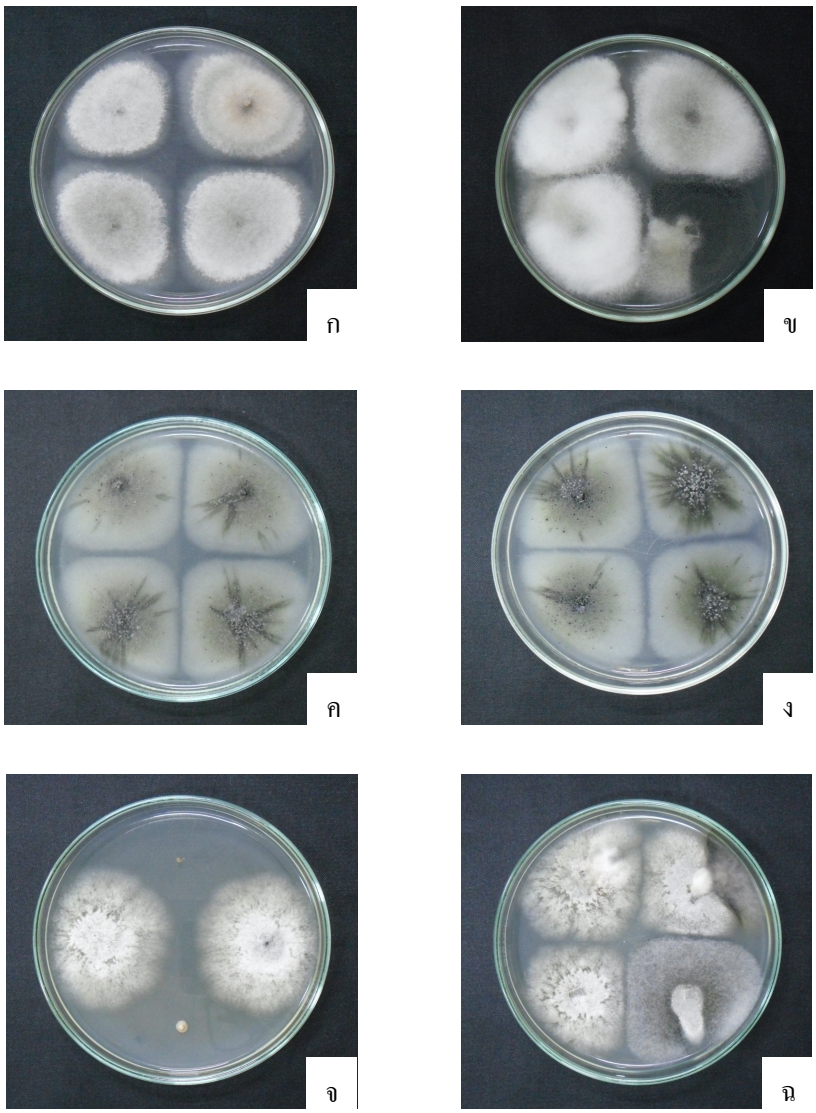
ค

ภาพที่ 10 ลักษณะอาการแผลบนใบพริกชี้ฟ้าหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 7 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) ปลูกเชื้อ *C. capsici* End 6

(ค) ปลูกเชื้อ *C. capsici* Path 6



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum* spp. จากการ re-isolate เชื้อหลังการปลูกเชื้อบนต้นพริกชี้ฟ้า

(ก) *C. gloeosporioides* End 3 แยกจากส่วนก้านใบ

(ข) *C. gloeosporioides* End 3 แยกจากส่วนใบ

(ค) *C. capsici* End 6 แยกจากส่วนก้านใบ

(ง) *C. capsici* End 6 แยกจากส่วนใบ

(จ) *C. capsici* Path 6 แยกจากส่วนก้านใบ

(ฉ) *C. capsici* Path 6 แยกจากส่วนใบ

6. การคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

6.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

จากการนำเชื้อราเอนไฟท์ที่แยกได้ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ด้วยวิธี dual culture โดยวัดผลในวันที่ 4 พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ 64 ไอโซเลท จาก 146 ไอโซเลท (43.84%) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนของรากต้นพริกจำนวน 18 ไอโซเลท เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบของต้นพริกจำนวน 10 ไอโซเลท และเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนของกิ่งต้นพริกจำนวน 36 ไอโซเลท ซึ่งประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริกไอโซเลท HSor1.1 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สูงที่สุด คือ 31.43% (ตารางที่ 10) ส่วนประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบต้นพริกไอโซเลท LRal1.1 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สูงที่สุด คือ 27.14% (ตารางที่ 11) และ ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์จากกิ่งต้นพริกไอโซเลท KSob2.2 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สูงที่สุด คือ 48.10% (ตารางที่ 10) สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกิ่งต้นพริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สูง 3 ไอโซเลท คือ KSob2.2, KSob1.1 และ SChb1.4 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 48.10% 35.71% และ 32.86%ตามลำดับ (ตารางที่ 10, ภาพที่ 12 และ 13)

เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก เชื้อราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริกได้โดยการแย่งพื้นที่ และเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกิ่งต้นพริก ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีนั้น เชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้โดยการแย่งพื้นที่ และเชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านี้ไม่สร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่สามารถจำแนกชนิดเชื้อราทั้ง 3 ได้ จึงไม่นำเอาเชื้อราทั้ง 3 ชนิดไปศึกษาในขั้นต่อไป และเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคลำดับถัดมาทั้งเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากราก ใบ และกิ่งต้นพริกนั้น เชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้โดยการแย่งพื้นที่เช่นกัน และเชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านี้ถือว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำ

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 โดยเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก ใบพริก และกิ่งต้นพริก

ราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก		ราเอนโดไฟท์จากใบพริก		ราเอนโดไฟท์จากกิ่งต้นพริก	
Isolate no.	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**
1. HSor1.1	31.43	1. LRal1.1	27.14	1. KSob2.2	48.10
2. HSor2.1	27.62	2. KSol2.1	23.33	2. KSob1.1	35.71
3. MChr2.4	16.67	3. LRal1.6	22.38	3. SChb1.4	32.86
4. SChr1.1	16.19	4. TSul1.1	16.67	4. HSob1.3	32.38
5. MRar1.1	11.90	5. KSol1.1	15.24	5. LRab1.2	26.67
6. HSor2.2	11.43	6. LRal2.3	14.76	6. KSob2.3	26.19
7. *Fusarium* sp. (TSur1.1)	10.48	7. LRal1.5	12.86	7. MChb1.2	25.24
8. *Xylaria* sp. (MRar1.7)	9.52	8. MChl2.2	11.90	8. KSob1.2	23.33
9. *Aspergillus* sp. (KSor2.2)	6.67	9. KSol1.2	6.67	9. *Colletotrichum* sp. (HSob2.1)	19.52
10. *Cladosporium* sp. (MRar1.2)	6.67	10. LRal3.2	5.24	10. HSob1.5	19.05
11. *Fusarium* sp. (LRar3.1)	6.67			11. MChb1.3	19.05
12. SChr1.4	5.71			12. HSob1.4	17.14
13. MRar2.1	5.71			13. LRab2.4	17.14
14. *Fusarium* sp. (MRar2.3)	5.24			14. MChb2.1	14.76
15. MRar1.5	4.29			15. SChb1.3	14.29
16. *Pseudeurotium* sp. (MRar1.3)	3.33			16. MRab2.1	13.81
17. *Chaetomium* sp. (HSor2.3)	1.43			17. HSob1.6	12.86

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก		ราเอนโดไฟท์จากใบพริก		ราเอนโดไฟท์จากกิ่งต้นพริก	
Isolate no.	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**
18. MChr2.3	1.43			18. *Colletotrichum* sp. (HSob2.2)	12.86
				19. TSub1.5	12.86
				20. MChb1.1	11.90
				21. HSob2.3	11.43
				22. HSob2.4	11.43
				23. TSub1.2	11.43
				24. TSub1.1	10.95
				25. *Colletotrichum* sp. (TSub1.3)	10.95
				26. MChb1.4	10.95
				27. MRab3.2	10.95
				28. SChb1.2	10.00
				29. LRab2.5	9.52
				30. *Fusarium* sp. (HSob1.2)	8.57
				31. *Pestalotiopsis* sp. (LRab2.6)	8.10
				32. MChb2.2	7.62
				33. LRab3.4	7.62
				34. HSob1.1	6.67

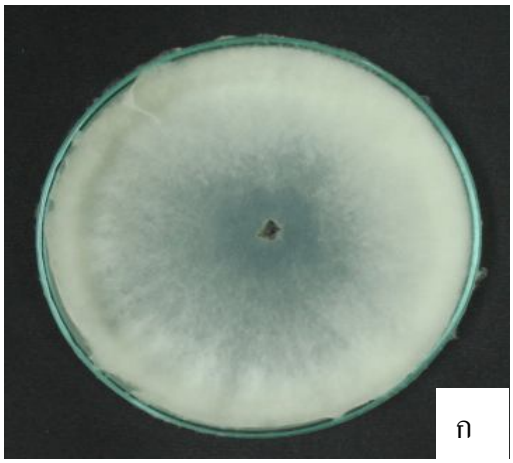
ตารางที่ 10 (ต่อ)

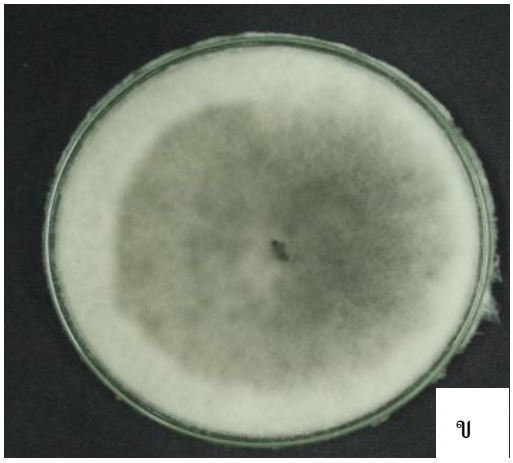
ราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก		ราเอนโดไฟท์จากใบพริก		ราเอนโดไฟท์จากกิ่งต้นพริก	
Isolate no.	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**	**Isolate no.**	**PIRG[1/2/]**
				35. *Colletotrichum* sp. (TSub1.4)	5.71
				36. *Colletotrichum* sp. (MRab1.1)	4.29
n(%) = 18 (51.43%) (total = 35)		n(%) = 10 (17.54%) (total = 57)		n(%) = 36 (66.67%) (total = 54)	

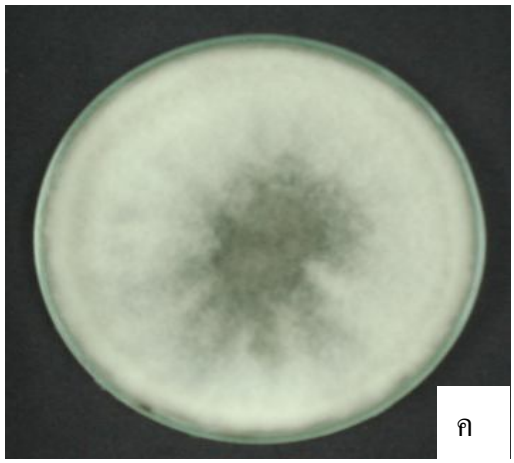
[1/] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S5 โดยเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากต้นพริก ใบพริก และกิ่งต้นพริก คำนวณจาก

$$\left(\frac{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } S.\ rolfsii \text{ กรรมวิธีควบคุม} - \text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } S.\ rolfsii \text{ กรรมวิธีทดสอบ}}{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } S.\ rolfsii \text{ กรรมวิธีควบคุม}} \right) \times 100$$

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ





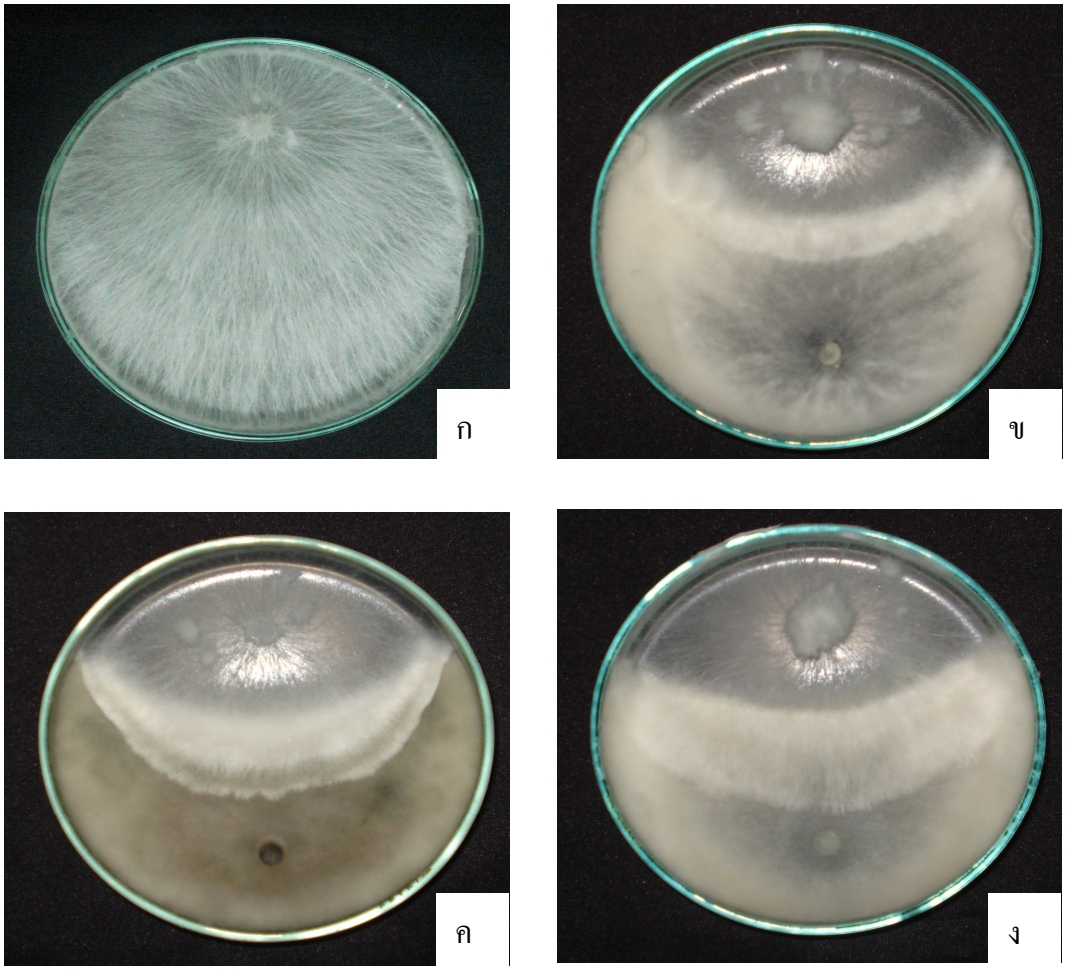


ภาพที่ 12 ลักษณะของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5

(ก) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท KSob2.2 บนอาหาร PDA อายุ 4 วัน

(ข) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท KSob1.1 บนอาหาร PDA อายุ 4 วัน

(ค) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท SChb1.4 บนอาหาร PDA อายุ 4 วัน



ภาพที่ 13 การยับยั้งของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 และเชื้อราเอนโดไฟท์ หลังการทดสอบ 4 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท KSob2.2

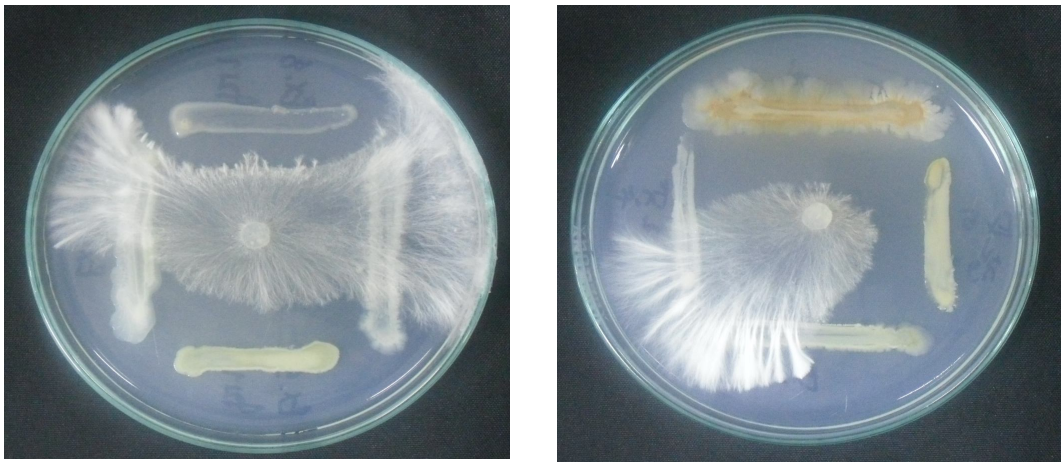
(ค) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท KSob1.1

(ง) ราเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท SChb1.4

6.2 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สาเหตุโรคของพริก

6.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เบื้องต้น (Screening)

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในเบื้องต้นซึ่งทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* (ภาพที่ 14) สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ในเบื้องต้นได้ 40 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนใบ 15 ไอโซเลท ก้านใบ 8 ไอโซเลท กิ่ง 8 ไอโซเลท และราก 9 ไอโซเลท



ภาพที่ 14 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 หลังการทดสอบ 4 วัน

6.2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5

จากการนำเชื้อแบคทีเรียเอนไฟท์ที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้นจำนวน 40 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNap1.3, BKaSur3.1 และ BKaSur1.3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 54.29% 54.29% และ 52.86% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 21 ไอโซเลท ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *S. rolfsii* มากกว่า 40% ใช้ในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 11)

6.2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C1

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 21 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSul3.2, BKaSup1.2 และ BPNap1.3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 70.95% 70% และ 69.05% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลทซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. capsici* มากกว่า 50% ใช้ในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 11)

6.2.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* C5

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSup1.2, BKaSul3.2 และ BPNap1.3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 98.10% 67.62% และ 64.29% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 8 ไอโซเลทซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. gloeosporioides* มากกว่า 50% ใช้ในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 11)

6.2.5 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce7

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 8 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSup1.2, BKaSul3.2 และ BPNap1.3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 98% 96.50% และ 96.25% ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 8 ไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Cer. capsici* มากกว่า 70% (ตารางที่ 11)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii, C. capsici, C. gloeosporioides* และ *Cer. capsici* สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 4 ชนิด โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BPNab1.1, BKSol1.3 และ BMSul1.5 ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 4 ชนิดได้

ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทอื่นๆ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บางไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคสูงนั้น เป็นการยับยั้งโดยการแย่งพื้นที่ ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการเจริญที่รวดเร็ว ลักษณะโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะเจริญแบบแผ่ปกคลุมโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1, BKSol1.3 และ BMSul1.5 ไปใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 15, 16, 17 และ 18)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5 *Colletotrichum capsici* C1 *Colletotrichum gloeosporioides* C5 และ *Cercospora capsici* Ce7 โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบ ก้านใบ กิ่ง และรากของต้นพริก

Isolate no.	**PIRG**[1/2/]			
	***S. rolfsii* S5**	***C. capsici* C1**	***C. gloeosporioides* C5**	***Cer. capsici* Ce7**
BPNap1.3	54.29	69.05	64.29	96.25
BKaSur3.1	54.29	60.00	52.86	70.63
BKaSur1.3	52.86	60.48	-	-
BKSol1.3	50.95	66.19	60.95	83.75
BPNab1.1	50.00	67.14	62.86	83.75
BPNap2.1	49.52	-	-	-
BPNal1.1	48.57	57.62	-	-
BKaSup1.2	48.10	70.00	98.10	98.00
BHuNap3.2	47.62	-	-	-
BHuNal3.1	47.14	-	-	-
BMSul1.5	46.67	65.71	64.29	82.50
BKaSul3.2	46.67	70.95	67.62	96.50
BHSol1.3	45.71	-	-	-
BKaSur1.3	45.71	-	-	-
BPNal1.2	45.24	55.71	50.95	83.13
BHuNap1.1	44.76	-	-	-

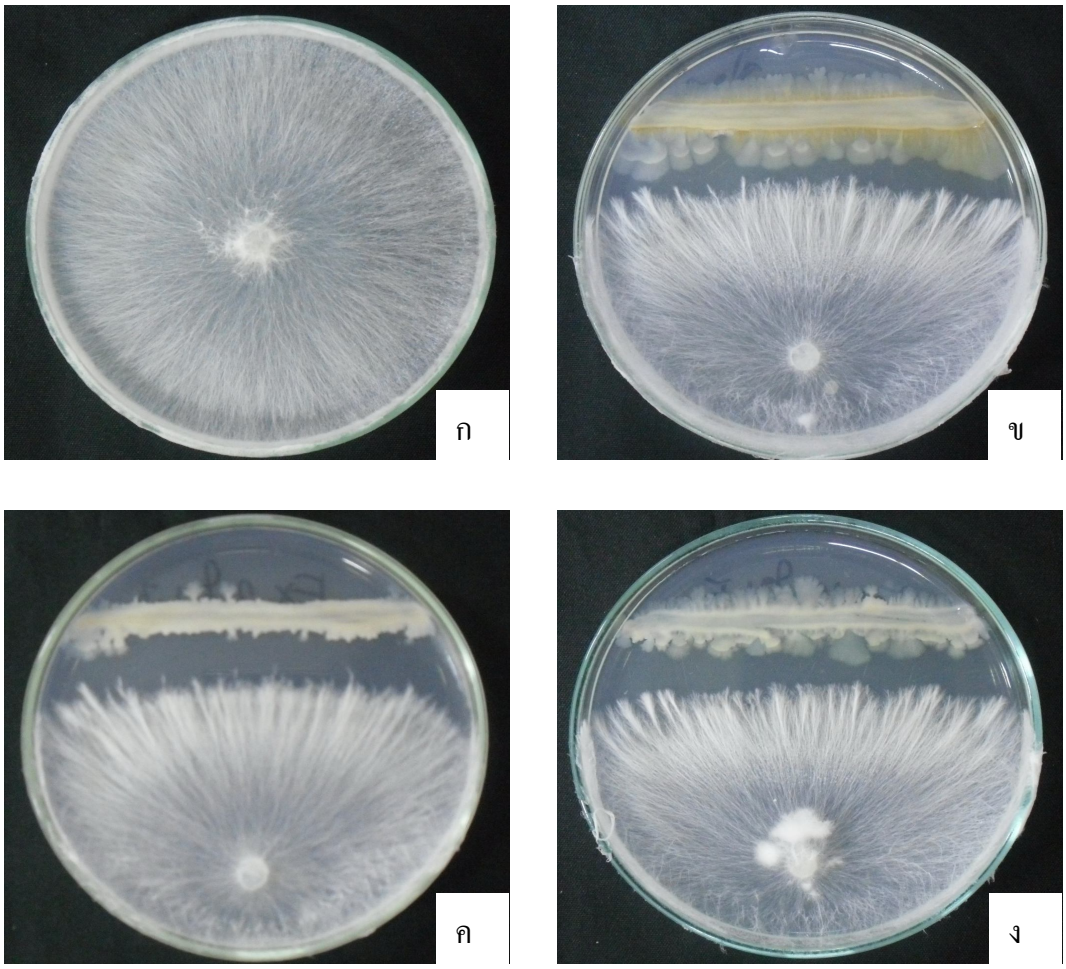
ตารางที่ 11 (ต่อ)

Isolate no.	PIRG[1/2/]			
	***S. rolfsii* S5**	***C. capsici* C1**	***C. gloeosporioides* C5**	***Cer. capsici* Ce7**
BHSol1.1	43.81	-	-	-
BPNal2.1	43.81	-	-	-
BMSul2.1	43.33	-	-	-
BMSur1.4	42.86	53.81	-	-
BPNab2.1	40.48	-	-	-

[1/] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S5 *C. capsici* C1 *C. gloeosporioides* C5 และ *Cer. capsici* Ce7 โดยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบ ก้านใบ กิ่ง และรากต้นพริก คำนวณจาก

$$\left(\frac{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคกรรมวิธีควบคุม} - \text{รัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } \textit{S. rolfsii} \text{ กรรมวิธีควบคุม}} \right) \times 100$$

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ



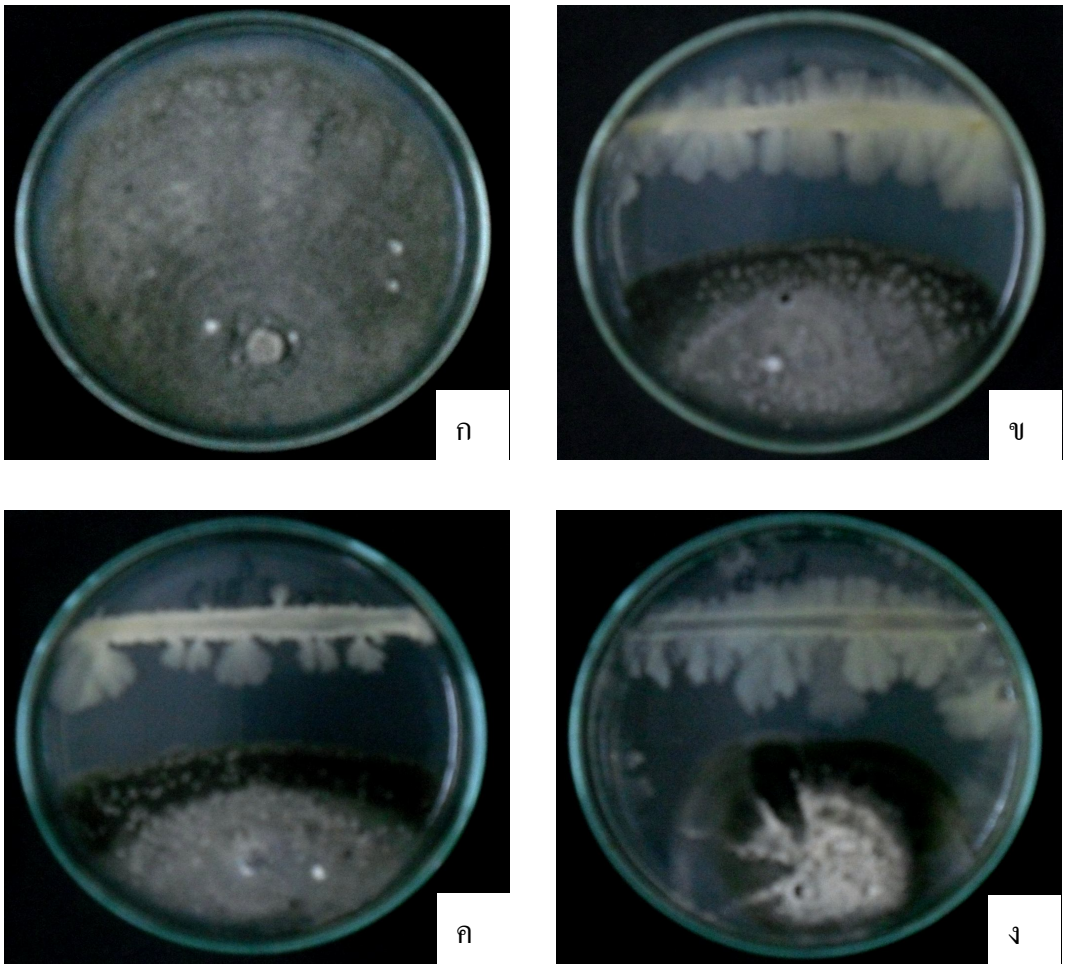
ภาพที่ 15 การเจริญของรา *Sclerotium rolfsii* S5 ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ หลังการทดสอบ 4 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท BPNab1.1

(ค) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BKSol1.3

(ง) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BMSul1.5



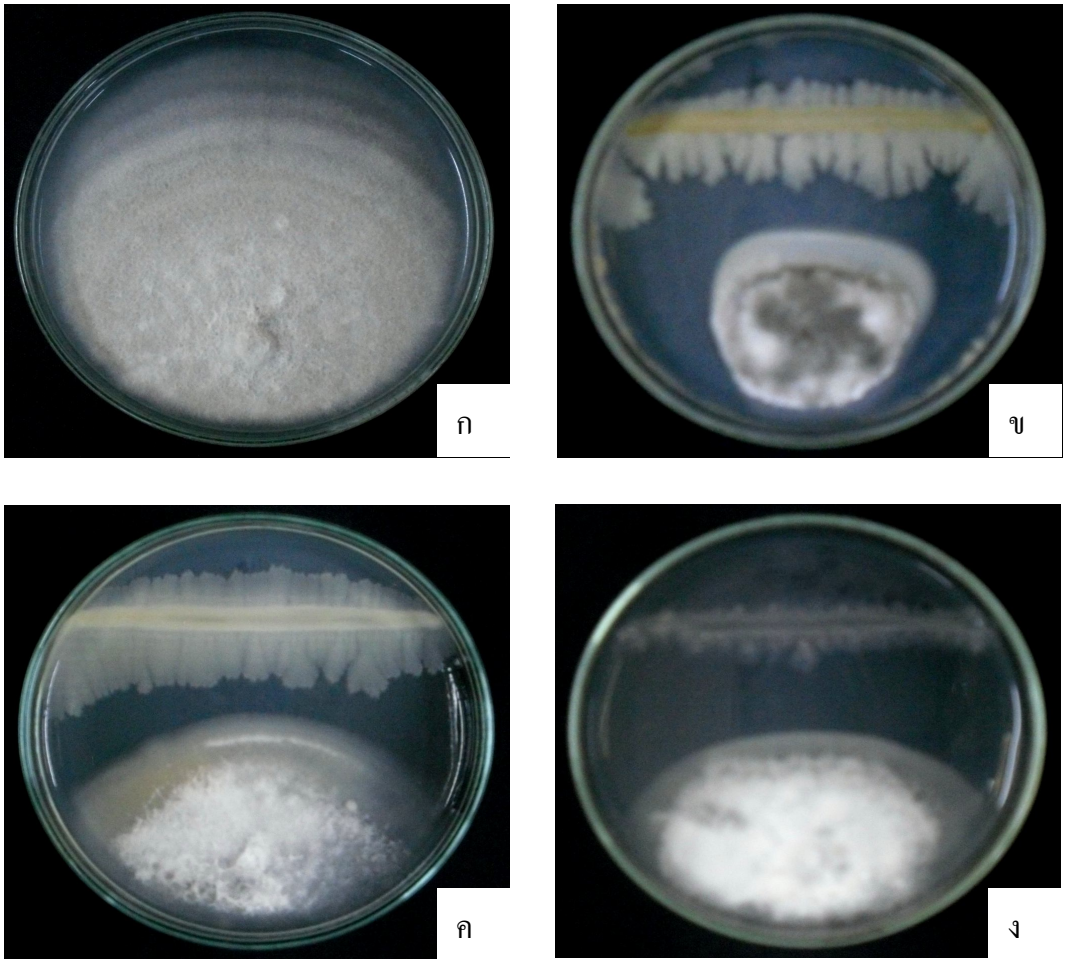
ภาพที่ 16 การเจริญของรา *Colletotrichum capsici* C1 ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ หลังการทดสอบ 12 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท BPNab1.1

(ค) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BKSol1.3

(ง) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BMSul1.5



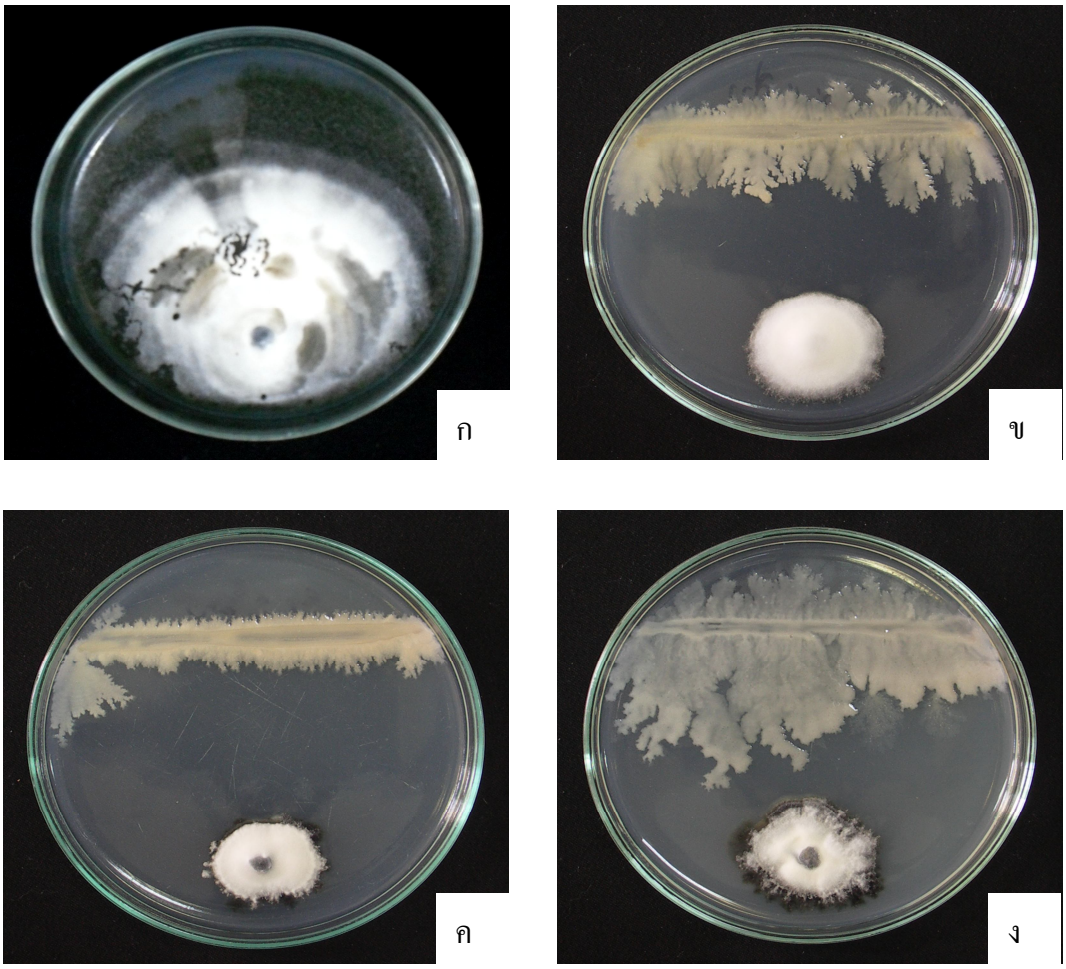
ภาพที่ 17 การเจริญของรา *Colletotrichum gloeosporioides* C5 ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ หลังการทดสอบ 12 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท BPNab1.1

(ค) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BKSol1.3

(ง) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BMSul1.5



ภาพที่ 18 การเจริญของรา *Cercospora capsici* Ce7 ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ หลังการทดสอบ 45 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากกิ่งไอโซเลท BPNab1.1

(ค) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BKSol1.3

(ง) แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบไอโซเลท BMSul1.5

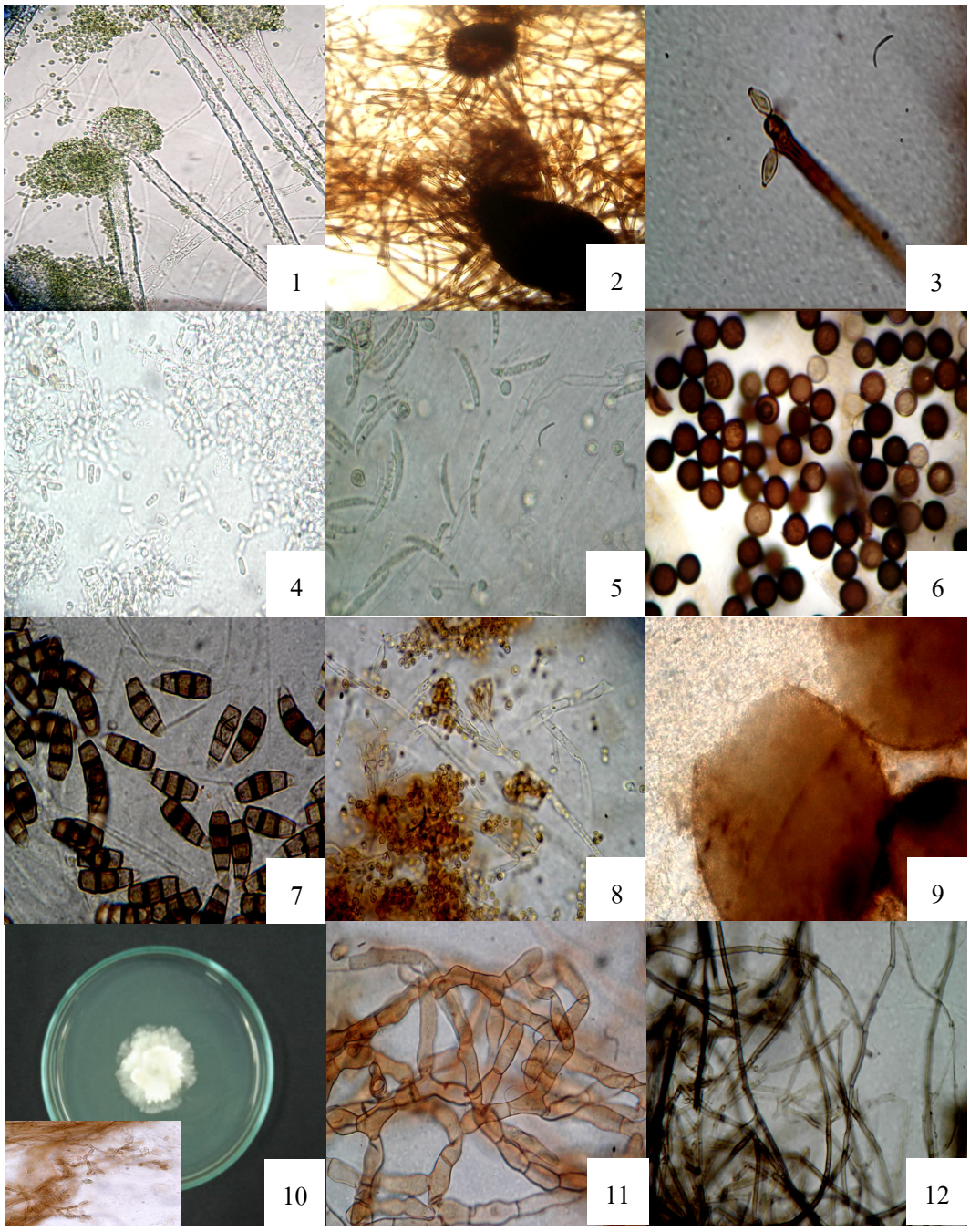
7. การจำแนกชนิดเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์

7.1 การจำแนกชนิดเชื้อราเอนโดไฟท์

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยการดูจากรูปร่าง ขนาด สีของสปอร์และลักษณะโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้นบนอาหาร จากเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 146 ไอโซเลท เชื้อราเอนโดไฟท์ 32 ไอโซเลทสร้างสปอร์ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดได้ 10 สกุล คิดเป็น 21.92 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราเอนโดไฟท์ 114 ไอโซเลท ไม่สร้างสปอร์จึงทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ คิดเป็น 78.08 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12, ภาพที่ 19)

ตารางที่ 12 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของต้นพริก

ชนิดของเชื้อรา	จำนวนไอโซเลทของเชื้อราจากส่วนต่างๆ ของพืช			รวม
	ราก	ใบ	กิ่ง	
1. *Aspergillus* sp.	1	-	-	1
2. *Chaetomium* sp.	1	-	-	1
3. *Cladosporium* sp.	1	-	-	1
4. *Colletotrichum* spp.	-	3	5	8
5. *Fusarium* spp.	12	-	1	13
6. *Gilmaniella* sp.	1	-	-	1
7. *Pestalotiopsis* spp.	1	2	1	4
8. *Penicillium* sp.	1	-	-	1
9. *Pseudeurotium* sp.	1	-	-	1
10. *Xylaria* sp.	1	-	-	1
11. Mycelia Sterilia	15	52	47	114
รวม	35	57	54	146

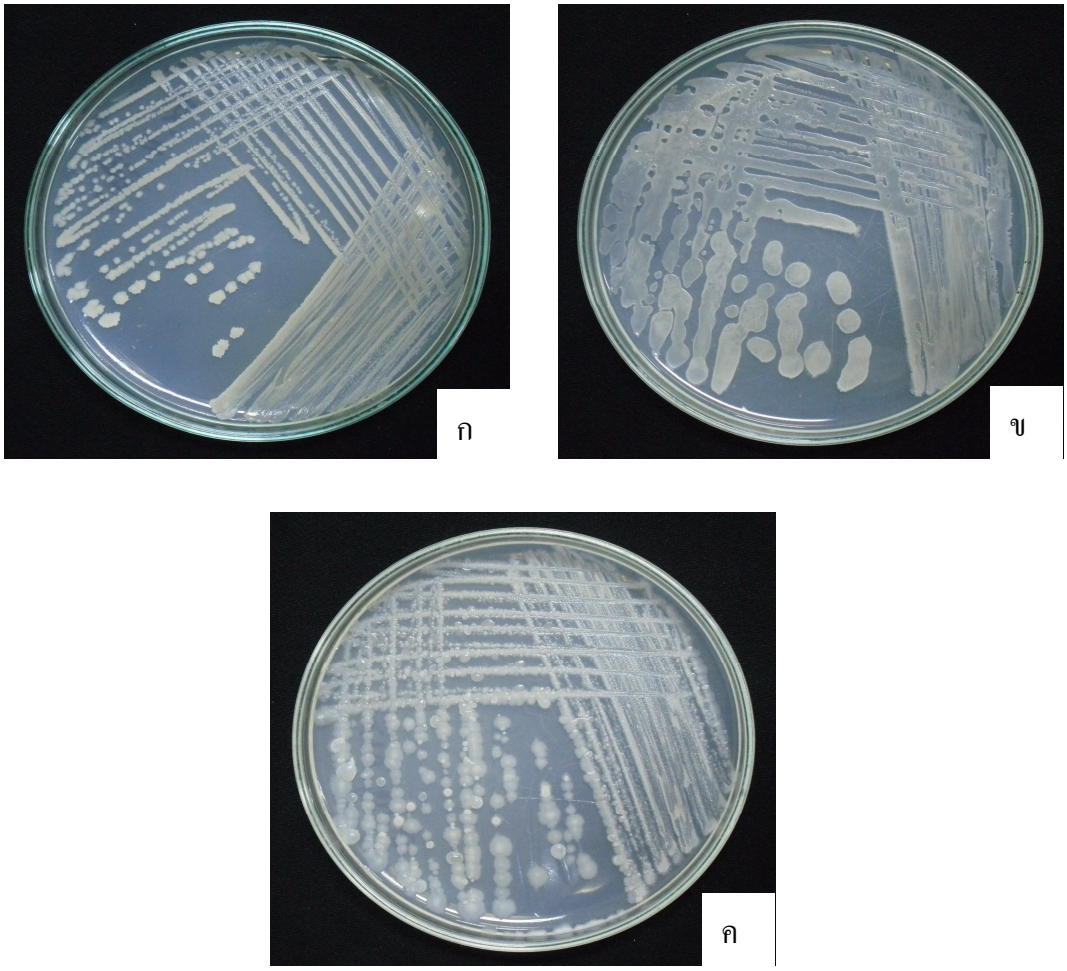


ภาพที่ 19 เชื้อราเอนโดไฟท์

1. *Aspergillus* sp.
2. *Chaetomium* sp.
3. *Cladosporium* sp.
4. *Colletotrichum* sp.
5. *Fusarium* sp.
6. *Gilmaniella* sp.
7. *Pestalotiopsis* sp.
8. *Penicillium* sp.
9. *Pseudeurotium* sp.
10. *Xylaria* sp.
11.-12. Mycelia Sterilia

7.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1 BKSol1.3 และ BMSul1.5 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริก เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเป็นรอยย่น นูน โคโลนีแผ่ ขอบไม่เรียบ สีขาวครีม เมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียรูปแท่งต่อกันเป็นสาย ติดสีม่วงเป็นแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ได้ มีเอนโดสปอร์รูปร่างรีโดยพบสปอร์บริเวณกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ (ภาพที่ 20, ภาพที่ 21) ซึ่งได้ทำการส่งเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไปทำการจำแนกชนิดที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท ตรงกับ Accession number HQ263251 ซึ่งคือเชื้อ *Bacillus subtilis* มีความเหมือน (similarity) 100 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการศึกษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อพืชต่างๆ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. Moundt และ Hinckle (1976) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรังไข่และเมล็ดของพืช เชื้อที่แยกได้จำนวน 1 ใน 3 พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. Walker และคณะ (1998) แยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชตระกูลถั่ว ได้จำนวน 92 ไอโซเลท พบเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 72 ไอโซเลท การศึกษาของ Wang และคณะ (2009) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* EB-28 เป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากลำต้นของต้นมะเขือเทศ สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคผลเน่าของมะเขือเทศ Dias และคณะ (2009) คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อเจริญของสตรอเบอรี่ พบเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งส่งเสริมการเจริญของรากต้นสตรอเบอรี่ ส่วน Liu และคณะ (2009) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *B. subtilis* E1R-j จากรากของข้าวสาลี ซึ่งสามารถยับยั้งโรค take-all ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Gaeumannomyces graminis*

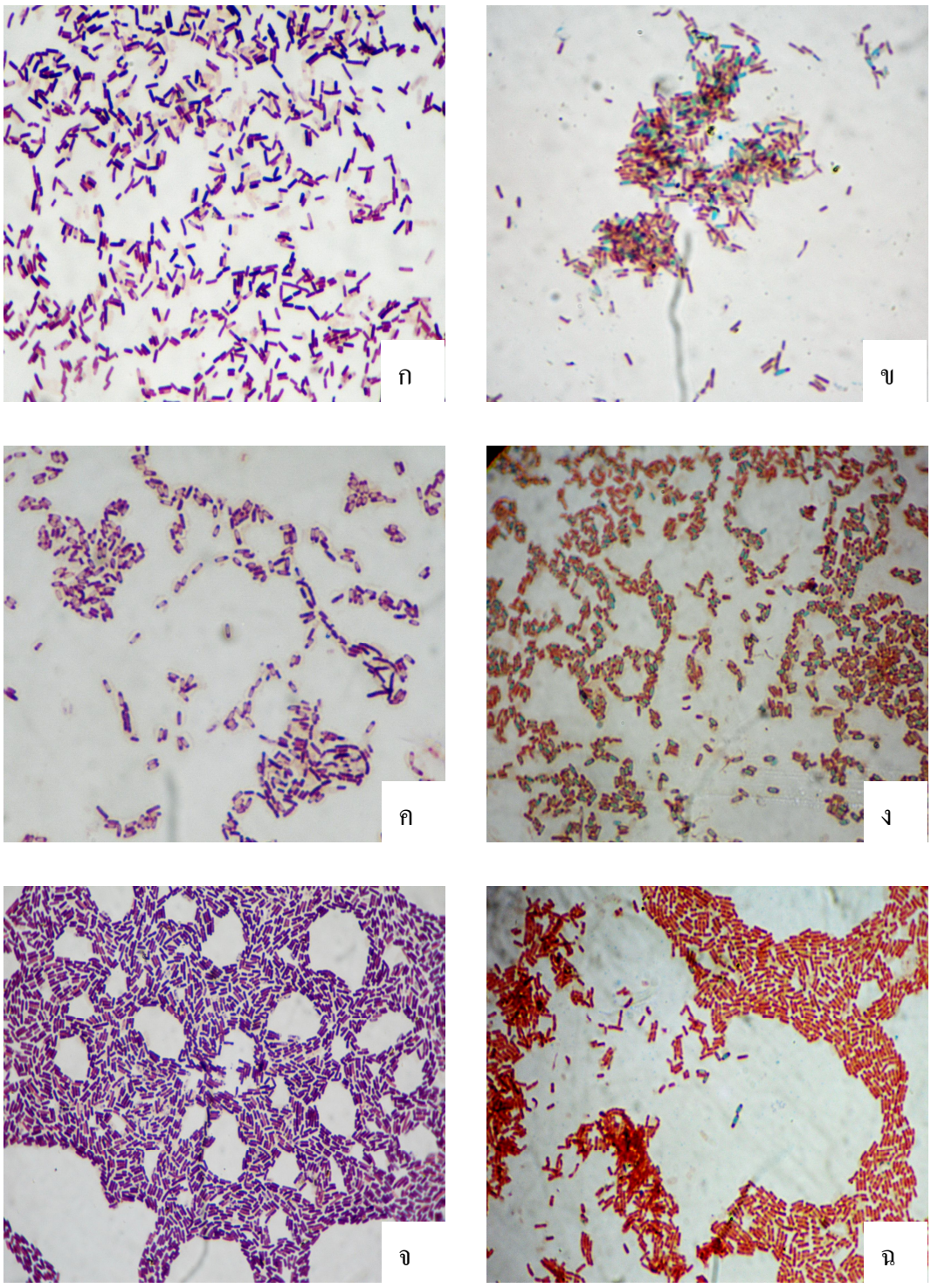


ภาพที่ 20 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ บนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง

(ก) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1

(ข) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3

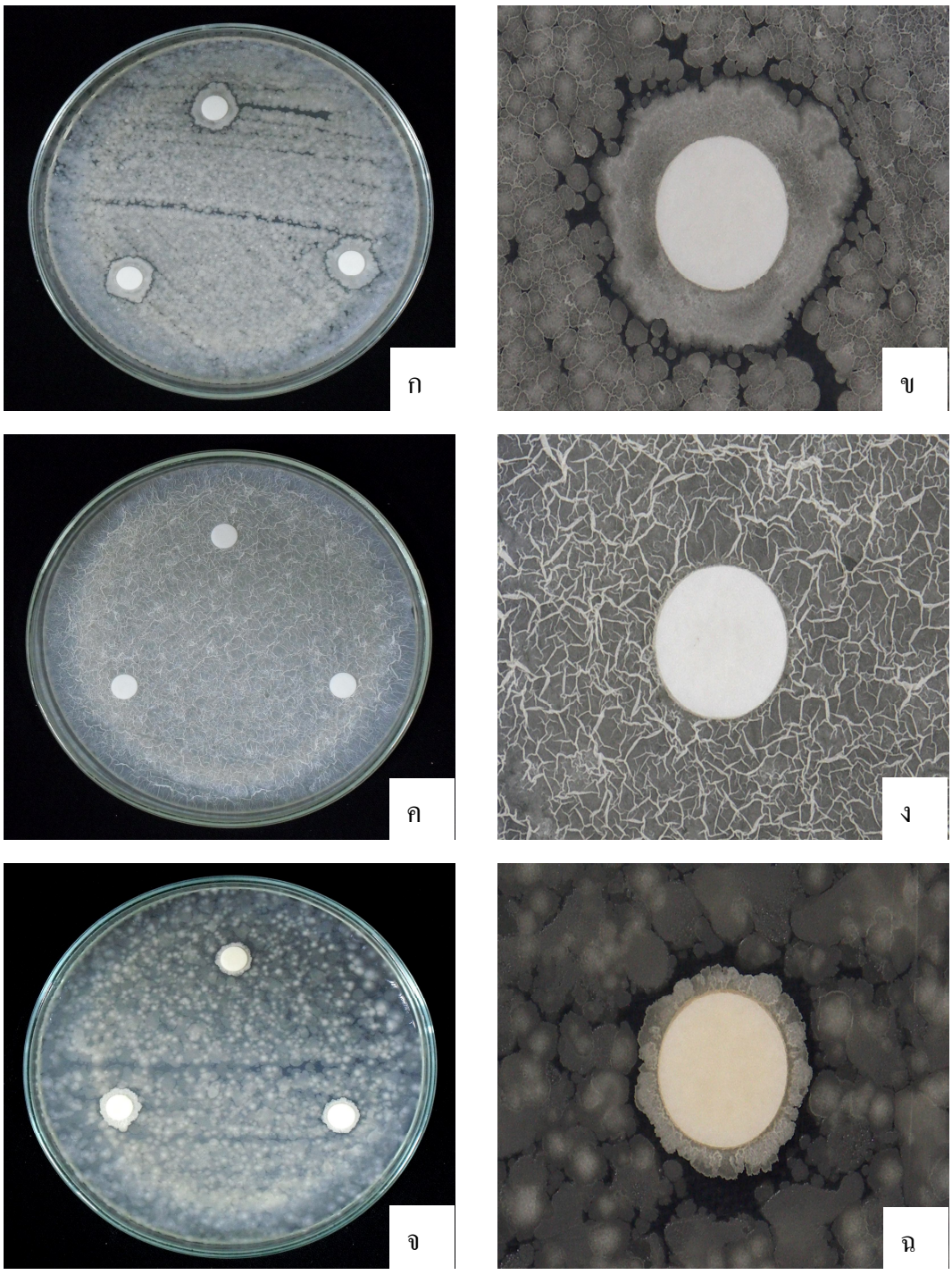
(ค) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul1.5



ภาพ 21 ลักษณะรูปร่าง การติดสีของเซลล์แบคทีเรียและลักษณะรูปร่างของเอนโดสปอร์
(ก)-(ข) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1
(ค)-(ง) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3
(จ)-(ฉ) เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul1.5

8. การทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยการเกลี่ยแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 1 ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA และหยดแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 2 ลงบน disc โดยทำการทดสอบเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมด 3 คู่ ดังนี้ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1 และ BKSol1.3 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3 และ BMSul1.5 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul1.5 และ BPNab1.1 พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3 และ BMSul1.5 ไม่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญต่อกัน (ภาพที่ 22) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3 สามารถนำมาใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul1.5 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกได้ ซึ่งการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ร่วมกันนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แตกต่างกัน เชื้อบางตัวอาจจะมีคุณสมบัติที่เด่นในการส่งเสริมการเจริญของพืช ทำให้พืชมีความแข็งแรง ส่วนเชื้อบางตัวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ร่วมกันอาจจะช่วยส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งการนำเชื้อทั้ง 2 ชนิด มาใช้ร่วมกันในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ควรทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อก่อนเพื่อป้องกันการที่เชื้อที่นำมาใช้ร่วมกันนั้นเกิดปฏิกิริยายับยั้งการเจริญกัน จากการทดลองของ Ryu และคณะ (1999) ใช้ LS213 ซึ่งเป็นสูตรสำเร็จของเชื้อ *B. subtilis* GB03 และ *B. amyloliquefaciens* IN937 พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงและยังช่วยลดระดับความรุนแรงของโรค cucumber mosaic virus ของมะเขือเทศ



ภาพที่ 22 ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร MHA

(ก)-(ข) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab1.1 และ BKSol1.3

(ค)-(ง) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol1.3 และ BMSul1.5

(จ)-(ฉ) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul1.5 และ BPNab1.1

9. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการลดการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 3 ไอโซเลท ในการลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าด้วยวิธี standard blotter plate โดยปลูกเชื้อบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *C. capsici* ก่อนแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และทำการประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคในวันที่ 9 หลังการปลูกเชื้อรา *C. capsici* พบว่าในกรรมวิธีควบคุมมีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสเท่ากับ 88.48 ส่วนกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 มีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 31.84 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BPNab1.1 *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 เพียงอย่างเดียว ที่มีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 63.20, 81.92, 69.12 และ 75.18 ตามลำดับ (ตารางที่ 13, ภาพที่ 23) สอดคล้องกับการทดลองของปฏิมาพร (2551) รายงานว่าการใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า สูงกว่าการใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว

เมล็ดพันธุ์พริกที่นำมาปลูกหากมีเชื้อสาเหตุโรคติดมากับเมล็ด โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสที่มีเชื้อรา *C. capsici* เป็นเชื้อสาเหตุโรค ย่อมส่งผลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริก ทำให้คุณภาพและปริมาณของผลผลิตต่ำ ดังนั้นการแช่เมล็ดก่อนปลูกด้วยเชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 จะช่วยลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค เท่ากับ 35.98 สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม และในทุกกรรมวิธีที่แช่เมล็ดพันธุ์พริกด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ดีกว่าในกรรมวิธีควบคุม

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการลดการเข้าทำลายเมล็ดพริกชี้ฟ้าโดยเชื้อ *Colletotrichum capcisi* เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

กรรมวิธี[1/]	ระดับการเกิดโรค[2/]	ดัชนีการเกิดโรค[3/]	เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค[4/]
กรรมวิธีควบคุม	4.42e[5/]	88.48e	0.00
B. subtilis BPNab1.1 (10^8 cfu/ml)	4.10de	81.92de	7.41
B. subtilis BKSol1.3 (10^8 cfu/ml)	3.46bc	69.12bc	21.88
B. subtilis BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	3.76cd	75.18cd	15.03
B. subtilis BKSol1.3+*B. subtilis* BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	1.59a	31.84a	35.98
คาร์เบนดาซิม (1,600 mg/L)	3.16b	63.20b	28.57

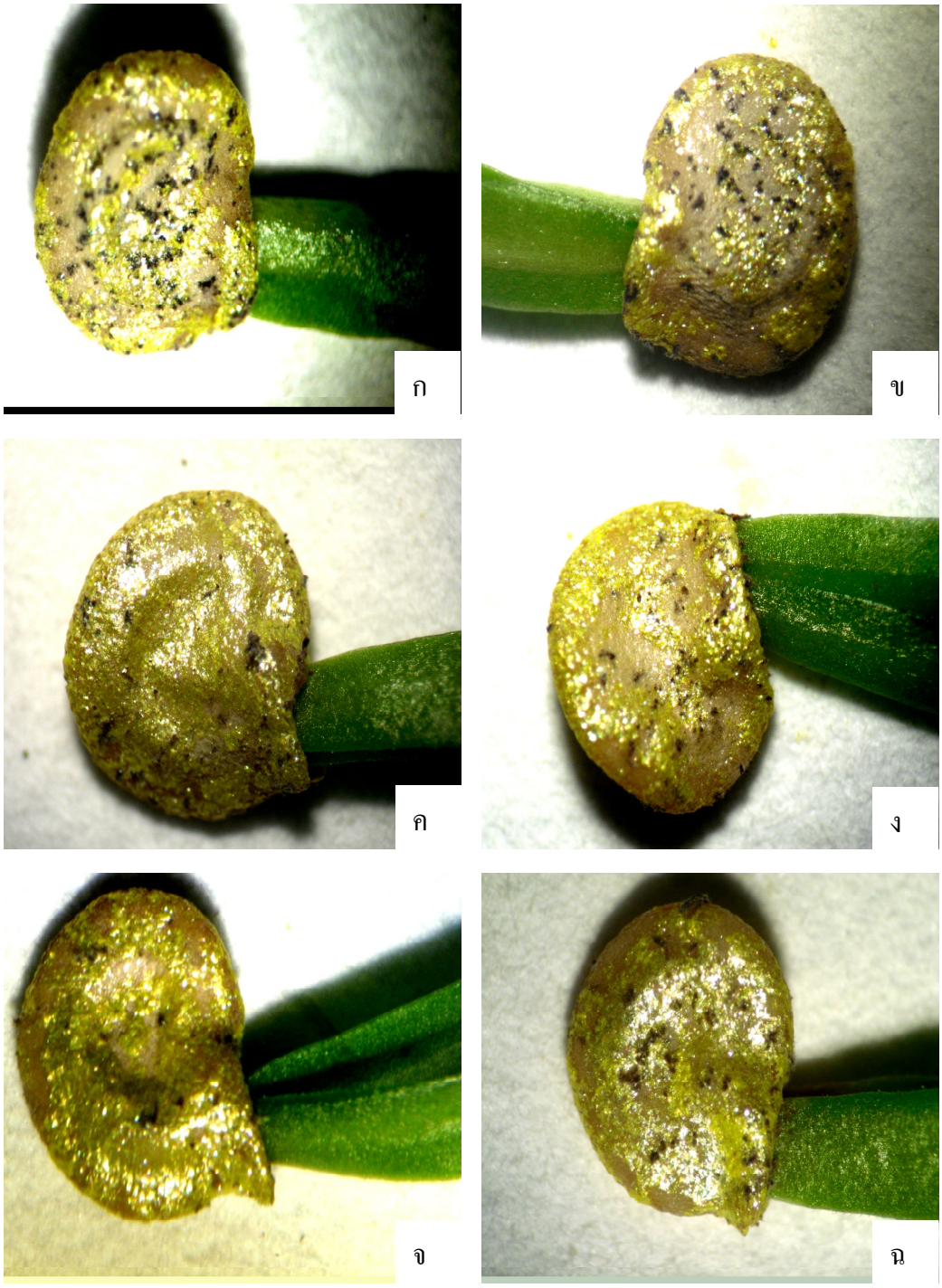
[1/]ปลูกเชื้อรา *C. capsici* บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 2 วัน ก่อนแช่ด้วยเชื้อ *B. subtilis* คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคในวันที่ 9 หลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

[2/] ระดับความรุนแรงการเกิดโรคแอนแทรคโนส (0, ไม่พบ acervulus; 1, 1-5 acervulus ต่อเมล็ด; 2, 6-10 acervulus ต่อเมล็ด; 3, 11-15 acervulus ต่อเมล็ด; 4, 16-20 acervulus ต่อเมล็ด; 5, มากกว่า 21 acervulus ต่อเมล็ด)

[3/] ดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนส = $\left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x 100}}{\text{จำนวนเมล็ดพริกชี้ฟ้า x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$

[4/] เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค = $100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ x 100}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$

[5/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 23 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้า หลังการทดสอบ 11 วัน

(ก) กรรมวิธีควบคุม

(ข) เชื้อ *B. subtilis* BPNab1.1

(ค) เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3

(ง) เชื้อ *B. subtilis* BMSul1.5

(จ) เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5

(ฉ) สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

10. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุม โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

10.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtiis* ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าอายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol1.3 *B. subtilis* BMSul1.5 คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคด้วยวิธี descriptive area กับผลพริกชี้ฟ้าทั้งต้น พบว่าการพ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอยและคาร์เบนดาซิม สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสในสภาพแปลงทดลองได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่น โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 มีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 mg/L (ตารางที่ 19) ดังนั้นการใช้เชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 จึงมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เช่นเดียวกับการทดลองของ Reddy และคณะ (1999) ที่รายงานว่าการใช้ LS213 ซึ่งเป็นสูตรสำเร็จของเชื้อ *B. subtilis* strain GB03 ผสมกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* strain IN937 สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและลดระดับการเกิดโรคทางใบของพืชได้ดีกว่าการใช้สูตรสำเร็จของเชื้อ *B. subtilis* strain GB03 หรือ *B. amyloliquefaciens* strain IN937 เพียงชนิดเดียวและ เมื่อนำสูตรสำเร็จ LS213 มาศึกษาต่อโดยการผสม สูตรสำเร็จ LS213 กับเชื้อ *Chryseobacterium balustinum* CECT 5399, *Pseudomonas fluorescens* CECT 5398 และ *B. licheniformis* CECT 5106 พบว่า สูตรสำเร็จ LS213 ผสมกับ *Pseudomonas fluorescens* CECT 5398 สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศและต้นพริก และลดความรุนแรงของการเกิดโรค Fusarium wilt และ Rhizoctonia damping-off ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่ากรรมวิธีอื่น

ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 และคาร์เบนดาซิม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่น โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 14)

10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า จากผลการทดลองพบว่าการพ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย และคาร์เบนดาซิมสามารถลดการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราในสภาพแปลงทดลองได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 14) โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* BMSul1.5 *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 มีดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 mg/L

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี[1/]	ดัชนีการเกิดโรค[2/]		เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค[3/]		ผลผลิต[5/]
	แอนแทรคโนส	ใบจุดเซอร์คอสปอรา	แอนแทรคโนส	ใบจุดเซอร์คอสปอรา	(กิโลกรัมต่อไร่)
น้ำกลั่น	36.25d[4/]	39.38b	0.00	0.00	217.80c
B. subtilis BKSol1.3 (10^8 cfu/ml)	13.13b	32.50ab	63.78	17.47	243.08c
B. subtilis BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	25.63c	30.63a	29.30	22.22	278.42bc
B. subtilis BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	9.25a	28.13a	74.48	28.57	360.20a
คาร์เบนดาซิม (1,600 mg/L)	8.75a	28.75a	75.86	27.99	339.58ab

[1/] พ่นด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus subtilis* และคาร์เบนดาซิม ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน

[2/] ดัชนีการเกิดโรค $= \left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x 100}}{\text{จำนวนเมล็ดพริกชี้ฟ้า x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$

[3/] เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค $= 100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ x 100}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$

[4/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

[5/] คำนวณโดยใช้อัตรา 2,750 ต้นต่อไร่ (สาวิตร แสงจันทร์, 2547) เก็บผลผลิตจนพริกมีอายุ 3 เดือน

10.3 การทดสอบประสิทธภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เมื่อราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าอายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย คาร์บอกซิน ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน และปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* อัตราส่วน 5 กรัมต่อถุงพร้อมกับย้ายปลูกต้นกล้าพริกชี้ฟ้า และปลูกเชื้อสาเหตุโรคอัตราส่วน 15 กรัมต่อถุง เมื่อต้นพริกอายุ 2 เดือนและ 3 เดือน เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงของโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าโดยนับจำนวนต้นที่ตาย พบว่าหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคครั้งที่ 1 ต้นพริกถูกเชื้อ *S. rolfsii* เข้าทำลายประมาณ 3-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใส่เชื้อครั้งที่ 2 พบว่าอัตราการตายของต้นพริกเพิ่มสูงขึ้นทุกกรรมวิธี ต้นพริกถูกเชื้อเข้าทำลายประมาณ 7-29 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใส่เชื้อครั้งที่ 3 อัตราการตายของต้นพริกลดลงทุกกรรมวิธี โดยเชื้อเข้าทำลายประมาณ 0-9 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าในกรรมวิธีที่ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 และ คาร์บอกซิน อัตราการตายของต้นพริกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 20) และทุกกรรมวิธีอัตราการตายของต้นพริกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น จากรายงานของ Fukui และคณะ (1996) ; Pierson และ Weller (1994) ; Duffy และคณะ (1996) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในดิน พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผสมกันมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคมากกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงชนิดเดียว

ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BMSul1.5 และ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น และกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน (ตารางที่ 15) เนื่องจากกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณรอบโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน ต้นพริกชี้ฟ้าแสดงอาการ phytotoxic ซึ่งจะแสดงอาการขอบใบมีสีเหลือง ใบไหม้ และต้นแคระแกร็น ซึ่งการใช้สารกำจัดเชื้อราในปริมาณที่กำหนดให้ใช้ หากใช้ในการกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคในอัตราความถี่ของการใช้ที่บ่อยเกินไปซึ่งเกินอัตราความเหมาะสมที่แนะนำให้ใช้ตามฉลากก็จะทำให้ต้นพืชได้รับความเสียหายได้

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุมการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี[1/]	เปอร์เซ็นต์ต้นตายจากโรค[2/]				เปอร์เซ็นต์ต้นอยู่รอด[2/]	ผลผลิต[3/] (กิโลกรัมต่อไร่)
	ใส่เชื้อครั้งที่ 1	ใส่เชื้อครั้งที่ 2	ใส่เชื้อครั้งที่ 3	รวม		
น้ำกลั่น	15.00	28.75	8.75	52.50d	47.50	90.54b
B. subtilis BKSol1.3 (10^8 cfu/ml)	6.25	8.75	7.50	22.50c	77.50	95.63b
B. subtilis BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	6.25	11.25	3.75	21.25bc	78.75	113.56a
B. subtilis BKSol1.3 ผสม *B. subtilis* BMSul1.5 (10^8 cfu/ml)	5.00	7.50	2.50	15.00a	85.00	120.59a
คาร์บอกซิน (375 mg/L)	3.75	13.75	0.00	17.50ab	82.50	70.74c

[1/] พ่นด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus subtilis* และคาร์บอกซิน ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

[3/] คำนวณโดยใช้อัตรา 2,750 ต้นต่อไร่ (สาวิตร แสงจันทร์, 2547) เก็บผลผลิตจนพริกมีอายุ 3 เดือน

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพริก

สามารถเก็บตัวอย่างต้นพริกที่ไม่เป็นโรคจากแปลงปลูกพริกในพื้นที่จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี และสงขลา เพื่อมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้จำนวน 4 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างต้นพริกในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และสงขลา เพื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 4 ตัวอย่าง

2. การแยกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

2. การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพริก

จากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช พบว่า ส่วนของใบ มีจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมามากที่สุด คือ 00% รองลงมาคือส่วนของกิ่ง (95%) และส่วนของรากมีจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาน้อยที่สุด (38.57%) สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลท โดยแยกได้ส่วนใบมากที่สุด 57 ไอโซเลท

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพริก

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า ส่วนของราก มีจำนวนไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มากที่สุด 35.2% รองลงมาคือส่วนของก้านใบ (23.4%) และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 205 ไอโซเลท

3.-4. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า และการปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสในพื้นที่จังหวัดสงขลาได้จำนวน 6 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อ *C. capsici* จำนวน ไอโซเลท เมื่อทำการปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคบนผลพริกได้ และ *C. gloeosporioides* จำนวน 5 ไอโซเลท โดยไอโซเลท 5 มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุด ตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอราจำนวน 0 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Cer. capcisi* ได้ 0 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลท e7 สามารถก่อ

โรคได้รุนแรงที่สุด และเก็บตัวอย่างต้นพริกที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่าได้จำนวน 6 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 6 ไอโซเลท โดยไอโซเลท S5 ก่อโรคได้รุนแรงที่สุด

5. ความรุนแรงของรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อเป็นโรคของพริก

เชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเป็นโรค (ไอโซเลท Path -6) สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าไอโซเลท End -6 ทั้งบนผลพริกสีเขียวและสีแดง เชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท Path 6 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. capsici* ไอโซเลท End 6 และเชื้อ *C gloeosporioides* ไอโซเลท End -5 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Path -5 เชื้อ *C. capsici* ทั้ง ไอโซเลท Path 6 และ End 6 สามารถสร้าง acervulus บนเมล็ดพริกได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* เชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท Path -6) มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในระดับที่สูงกว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. (ไอโซเลท End -6) และพบว่าสามารถ re-isolate เชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท End -6 ได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. (Path -6)

6. เชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

6. เชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S5

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนของรากต้นพริกจำนวน 8 ไอโซเลท จากส่วนใบของต้นพริกจำนวน 0 ไอโซเลท และจากส่วนของกิ่งต้นพริกจำนวน 36 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* S5 โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกิ่งต้นพริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S5 สูง 3 อันดับแรก คือ KSob2.2, KSob .1และ S hb .4 (48. 0% 35.7 % และ 32.86% ตามลำดับ)

6.2 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNa 3, BKaSur3. และ BKaSur 3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. rolfsii* S5 54.29% 54.29% และ 52.86% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลทซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *S. rolfsii* S5 มากกว่า 40% เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici*

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSul3.2, BKaSup.2 และ BPNap.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* 70.95% 70% และ 69.05% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลทซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. capsici* มากกว่า 50% เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* 5

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSup.2, BKaSul3.2 และ BPNap.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* 5 98.0% 67.62% และ 64.29% ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 8 ไอโซเลท ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *C. gloeosporioides* 5 มากกว่า 50% เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* e7

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKaSup.2, BKaSul3.2 และ BPNap.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Cer. capsici* e7 98% 96.50% และ 96.25% ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 8 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Cer. capsici* e7 มากกว่า 70%

สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 4 ชนิด โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BPNab., BKSol.3 และ BMSul.5

7. การจำแนกชนิดเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์

พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ 32 ไอโซเลทสามารถจัดจำแนกชนิดได้ 0 จีนัส คิดเป็น 2.92 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ คิดเป็น 78.08 เปอร์เซ็นต์

เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BPNab. BKSol.3 และ BMSul.5 พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้างเอนโดสปอร์ ทำการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดเป็น *Bacillus subtilis*

8. ความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BKSol.3 สามารถนำมาใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท BMSul.5 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกได้

9. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการลดการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า

การใช้แบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ 35.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรคสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม กรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BPNab *B. subtilis* BKSol3 และ *B. subtilis* BMSul5 เพียงอย่างเดียว (28.57% 7.4% 2 88% และ 5.03% ตามลำดับ)

10. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุม โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

0. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า

กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 มีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่พ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 และคาร์เบนดาซิม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

0.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* BMSul5 *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 มีดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

0.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

ในกรรมวิธีที่ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 และ คาร์บอกซิน อัตราการตายของต้นพริกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BMSul5 และ *B. subtilis* BKSol3 ผสม *B. subtilis* BMSul5 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น และกรรมวิธีที่ใช้สาร

กำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน เนื่องจากกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณรอบโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน ต้นพริกชี้ฟ้าแสดงอาการ phytotoxic

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เกษม สร้อยทอง. 2551. เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตรา เกาะแก้ว เลขา มาโนช จีรพันธ์ วรพงษ์ นิพนธ์ วิสารทานนท์ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และ วรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2550. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2547. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2549. ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิรนาม. 2550. พริกขี้หนูลูกผสมซุปเปอร์ฮอท. ข่าวสารศรแดง 13 : 4-5.

ปวีณา มนตรี Taylor, P.W.J. และ อรรัตน์ มงคลพร. 2551. การตอบสนองของพริก 4 ชนิด ต่อเชื้อ *Colletotrichum capsici*, *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในประเทศไทย. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 . พืชสวนไทย ใต้ร่มพระบารมี, 26-30 พฤษภาคม 2551. โรงแรม อมรินทร์ลากูน อ. เมือง จังหวัดพิษณุโลก. น. 209.

ปฏิมาพร ปลอดภัย. 2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พราวมาส เจริญรักษ์ จิระเดช แจ่มสว่าง วรรณวิไล อินทนู และ ปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันดร์. 2548. การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ฉีดพ่นใบมะเขือเทศเพื่อลดการเกิดโรคราดำภายใต้สภาพเรือนพลาสติก. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7 . อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่. น. 359-369.

เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง. 2547. ความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2541. พริก. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คนึงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรอุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. *ใน* การประชุมวิชาการครั้งที่ 39 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 502-510.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2544. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. โรคพืช มข. ปริทรรศน์. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2549. โรคของผักและการควบคุมโรค. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศิริรัตน์ ใจแล. 2546. การควบคุม *Bipolaris sorokiniana* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าวบาร์เลย์โดยใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ในพืชตระกูลหญ้า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สาวิตร แสงจันทร์. 2547. พริกขี้หนูสรแดงพันธุ์ซุปเปอร์ฮอต สายพันธุ์ใหม่สร้างชีวิตใหม่แก่เกษตรกรไทย. [online] จาก : http :// www.Matichon.co.th/ techno.php? srctaq=05/6/24&srcday=2004/02/15&search=no (5/1/54)

สายสมร ลำยอง พิภพ ลำยอง นิตยา บุญทิม และ K.D., Hyde. 2541. การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย : รายงานการวิจัย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และสมบัติ ศรีชูวงศ์. 2546. การคัดเลือกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง. ว.เกษตร 19 : 176-188.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2540. การจัดการโรคพืช. กรุงเทพฯ : วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2546. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

อมรรัตน์ ชุมทอง. 2547. การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verde.) ที่เกิดจาก

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kunh. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Alstrom, S. 2000. Root-colonizing fungi from oilseed rape and their inhibition of *Verticillium dahliae*. Journal of Phytopathology 148 : 417-423.

Amico, M.D., Frisullo, S., Cirulli, M. 2008. Endophytic fungi occurring in funnel, lettuce, chicory, and celery-commercial crops in southern Italy. Mycological Research 112 : 100-107.

Assis, S.M.P., da Silveira, E.B., de Mariano, L.R. and Menezes, D. 1998. Endophytic bacteria-method for isolation and antagonistic potential against cabbage black rot. Summa Phytopathologica 24 : 216-220.

Azevedo, J.L., Maccheroni, W., Pereira, J.O. and Araujo, W.L. 2000. Endophytic microorganism : a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electric Journal of Biotechnology 3 : 40-65.

Bacilio-Jemenez, M., Aguilar-Flores, S., del Valle, M.V., Perez, A., Zepeda, A. and Zenteno, E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. Soil Biology and Biochemistry 33 : 167-172.

Baldani, V.L.D., Alvarez, M.A., Baldani, J.I. and Do´bereiner, J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant and Soil 90 : 35-46.

Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V. L. D., Goi, S. R. and Do´bereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology and Biochemistry 29 : 911-922.

Barka, E.A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.C. and Belarbi, A. 2002. Inhibitory effect of endophytic bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control 24 : 135–142.

Barraquio, W.L., Revilla, L.and Ladha, J.K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. Plant and Soil 194 : 15-24.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., Baraldi, R. and Bottini, R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter*

diazotrophicus and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation 24 : 7-11.

Bayman, P., Lebron, L.L., Tremblay, R.L. and Lodge, D. J. 1996. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytologist 135 : 143-149.

Blodgett, J.T., Swart, W.J., Louw, S.M. and Weeks, W.J. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems and roots. Mycologia 92 : 853-859.

Brown, G.E. 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. Phytopathology 65 : 404-409.

Brown, K.B., Johnson, G.I. and Guest, D.I. 2002. Endophytic fungi of durian in North Queensland : potential antagonists of *Phytophthora palmivora*. www. botany. unimelb.edu.au/ botanyunimelb/ 1pages/ research/ labs/ mycology/ duriansite/ pdf_ files/APPS2001/BrownPaper. pdf (1/11/2008)

Bunn, E. and Tan, B. 2002. Microbial contaminants in plant tissue culture propagation. pp. 307-335. *In* : Sivasithamparam, K., Dixon, K.W. and Barrett, R.L. (eds). Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Western Australia : Kluwer Academic Publishers.

Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Conners, I.L. and Sigler, L. 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Canada.

Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69 : 2-9.

Cerkauskas, R.F. and Sinclair, J.B. 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. Phytopathology 70 : 1036-1038.

Charigkapakorn, N. 2000. Control of chilli anthracnose by different biofungicides. [Online] Available from: http://www.arc-avrdc.org/pdf_files/029-Charigkapakorn_18th.pdf). (7/01/2010)

Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguez, K.R. and Kloepper J.W. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biological Control 5 : 83-91.

Clay, K. 1987. Effect of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. Oecologia 73 : 358-362.

Davis, E.C., Franklin, J.B., Shaw, A.J. and Vilgalys, R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. American Journal of Botany 90 : 1661-1667.

Daykin, M.E. and Milholland, R.D. 1984. Infection of blueberry fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 68 : 948-950.

Dias, A.C.F., Costa, F.E.C., Andreote, F.D., Lacava, P.T., Teixeira, M.A., Assumpcao, L.C., Araujo, W.L., Azevedo, J.L. and Melo, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25 : 189-195.

Dingle, J. and McGee, P.A. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. Mycological Research 107 : 310-316.

Dix, N.J. and Webster, J. 1995. Fungal Ecology. New York: Chapman & Hall.

Domenech, J., Reddy, M.S., Klopper, J.W., Romos, B. and Gutierrez-Manero, J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. Biological Control 51 : 245–258.

Duffy, B.K., Simon, A. and Weller, D.M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with *Pseudomonas fluorescens* for control of take-all on wheat. Phythopathology 86 : 188–194.

Eckert, J.W. and Ogawa, J.M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. Annual Reviews Phytopathology 23 : 421-454.

Edathil, T.T., Manian, S. and Udaiyan, K. 1996. Interaction of multiple VAM fungal species on root colonization, plant growth and nutrient status of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Agriculture, Ecosystems and Environment 59 : 63-68.

Elamo, P., Helander, M.L., Soloniemi, I. and Neuvonen, S. 1999. Birch family and environmental conditions affect endophytic fungi in leaves. Oecologia 118 : 151-156.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commomwealth Mycological Institute, Kew, England.

Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commomwealth Mycological Institute, Kew, England.

Fisher, P. J., Anson, A. E. and Petrini, O. 1986. Fungal endophytes in *Ulex europaceus* and *Ulex gallii*. Transcation of the Brithish Mycological Society 86 : 153-193.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D. and Abdala, G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.) : isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. Applied Microbiology and Biotechnology 76 : 1145-1152.

Fukui, R., Schroth, M.N., Hendson, M. and Hancock, J.G. 1994. Interaction between strains of *Pseudomonas* in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. Phytopathology 84 : 1322–1330.

Gabriel, B. and Upali, S. 2006. Activities and survival of endophytic bacteria in white clover (*Trifolium repens* L.). Canadian Journal of Microbiology 52 : 848-856.

Greulich, F., Horio, E., Shimanuki, T. and Yosihara, T. 1999. Field results confirm natural plant protection by endophytic fungus *Epichloe typhina* against the pathogenic fungus *Cladosporium phlei* on timothy leaves. Annual of the Phytopathological Society of Japan 65 : 454-459.

Hadden, J.F. and Black, L.L. 1987. Comparison of virulence of tomato and pepper isolates of *Colletotrichum* spp. Phytopathology 77 : 641.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43 : 895-914.

Hallmann, J., Rodriguez-Kabana, R. and Kloepper, J.W. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. Soil Biology and Biochemistry 31 : 551-560.

Hanada, R.E., Souza, T.J., Pomella, A.W.V., Hebbar, K.P., Pereira, J.O., Ismaiel, A. and Samuels, G.J. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte fromsapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. mycological research 112 : 1335–1343.

Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Costa, H.S., Bezerra, J.L., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. Fungal Biology 114 : 901-910.

Hanlin, R.T. 1998. Illustrated Genera of Ascomycetes II. The American Phytopathological Society USA.

Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z. and Su, W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 31 : 163-167.

Hung, P.Q. and Annapurna, K. 2004. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). Omonrice 12 : 92-101.

Isaac, S. 1992. Fungal-Plant Interaction. London : Chapman & Hall.

Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. and Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39 : 343–366.

Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Lee, S.W., Lim, H.K., Jang, K.S., Son, S.W., Lee, S.O., Cho, K.Y., Sung, N.D. and Kim, J.C. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. Letters in Applied Microbiology 44 : 332-337.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. Anisworth & Bisby' s Dictionary of the Fungi. United Kingdom : CAB International.

Lacey, L.A. and Neven, L.G. 2006. The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera : Gelechiidae) in stored potatoes. Journal of Invertebrate Pathology 91 : 195-198.

Lamb, T.G., Tonkyn, D.W. and Kluepfel, D.A. 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. Canadian Journal of Microbiology 42 : 1112-1120.

Lata, L.X.C., Silva, B., Morales, R.M. and Halda-Alija, L. 2006. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinacea* plants using 16S rRNA sequencing. Plant Cell Tissue and Organ Culture 85 : 353-359.

Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q. and Kang, Z. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. Biological Control 49 : 277-285.

Liu, C.H., Zou, W.X., Lu, H. and Tan, R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology 88 : 277-282.

Lu, H., Zou, W.X., Meng, J.C., Hu, J. and Tan, R. X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science 151 : 67-73.

Ma, Y.M., Li, Y., Liu, J.Y., Song, Y.C. and Tan, R.X. 2004. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. Fitoterapia 75 : 451-456.

Maccheroni, W., Araujo, W.L. and Azevedo, J.L. 2004. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. Scientia Agricola 61 : 298-302.

Melnick, R.L., Zidack, N.K., Bailey, B.A., Maximova, S.N., Mark, G. and Backman, P.A. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biological Control 46 : 46-56.

Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, C.D. and Moore, E.R.B. 2006. Endophytic bacteria diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. Systematic and Applied Microbiology 29 : 539-556.

Moundt, J.O. and Hinckle, N.F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. Applied and Environmental Microbiology 32 : 694-698.

Muller, J. 2003. Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonisation of *Lolium perenne*. Funtional Plant Biology 30 : 419-424.

Muirhead, I.F. and Deverall, B.J. 1981. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. Physiological Plant Pathology 19 : 77-84.

Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. Microbiology Research 164 : 290-296.

Narisawa, K., Ohki, K.T. and Hashiba, T. 2000. Suppression of clubroot and *Verticillium* yellows in Chinese cabbage in the field by root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*. Plant Pathology 49 : 141-146.

Nejad, P. and Johnson, P.A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control 18 : 208-215.

Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Baeza, J. and Rodriguez, J. 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation 57 : 129-135.

Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. and Pereira, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology 98 : 267–270.

Padgham, J.L. and Sikora, R.A. 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. Crop Protection 26 : 971-977.

Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. pp. 175-187. *In* : Fokkema, N.J. and Heuvel, J.V. (eds.). Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge : Cambridge University Press.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. pp. 179-197. *In* : Andrew, J.H. and Hirano, S.S. (eds.). Microbial Ecology of Leaves. New York : Springer-Verleg.

Petrini, L.E and Petrini, O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. Sydowia 38: 216-234.

Petrini, O., Petrini, L.E. and Rodrigues, K.F. 1995. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. Fitopatologia Brasileira 20 : 531-539.

Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycological Research 105 : 1508-1513.

Pierson, E.A and Weller, D.M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84 : 940–947.

Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology 23 : 97-129.

Quadt-Hallmann, A., and Kloepper, J.W. 1996. Immunological detection and localization of a cotton endophyte, *Enterobacter asburiae*, strain JM22 in different plant species. Canadian Journal of Microbiology 42 : 1144-1154.

Ramesh, R., Joshi, A.A. and Ghanekar, M. P. 2009. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 25 : 47-55.

Redlin, R.C. and Carris, L.M. 1985. Endophytic fungi of grasses and wood plants. St. Paul, Minnesota, USA : APS Press.

Rodrigues, K.F. and Petrini, O. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. pp. 57–69. *In* Hyde, K. D. (ed.). Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong : University of Hong Kong Press.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araujo, W.L., dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L. 2005. Diverisity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' broom disease. International Journal of Biological Sciences 1 : 24-33.

Ryu, C.M., Reddy, M.S., Zhang, S., Murphy, J.F., and Kloepper, J.W. 1999. Plant growth promotion of tomato by a biological preparation (LS213) and evaluation for protection against *Cucumber mosaic virus*. Plant Disease 80 : 891-894.

Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. and Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes : a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics. 29 : 319-343.

Sandhiya, G. S., Sugitha, T. C., Balachandar, D. and Kumar, K. 2005. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. Indian Journal of Experiment Biology 43 : 802-807.

Schardl, C.L. and Phillips, T.D. 1997. Protective grass endophytes : Where are they from and where are they going? Plant Disease 81 : 430-438.

Schwarz, M., Kopcke, B., Weber, R.W.S., Sterner, O. and Anke, H. 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. Phytochemistry 65 : 2239-2245.

Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. and Oelmuller, R. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. The Journal of Biological Chemistry 280 : 26241-26247.

Shi, J.Y., Liu, A.Y., Li, X.P., Feng, S.J. and Chen, W.X., 2010. Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture 90 : 227–232.

Smith, H., Wingfield, M.J. and Petrini, O. 1996. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. Forest Ecology and Management 89 : 189-195.

Sopalun, K. 2004. Production and Characterization of Phytase from an Endophyte Fungus MEC1. M.Sc. Thesis, Mahidol University, Thailand.

Spurr Jr., H. W. and Welty, G.W. 1975. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotina* spp. Phytopathology 65 : 417-422.

Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J. and Strobel, G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Science 165 : 913-922.

Strobel, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. Critical Reviews in Biotechnology 22 : 315-333.

Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67 : 491-502.

Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Arsenault, W.J. and Buchanan, N.A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. Plant Pathology 48 : 360–369.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes : Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commomwealth Mycological Institute, Kew, England.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In* : Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford: CAB International.

Ulrich, K., Stauber, T. and Ewald, D. 2008. *Paenibacillus*-a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of wood plants. Plant Cell Tissue Organ Culture 93 : 347-351.

Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Butehorn, B. and Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Applied and Environmental Microbiology 65 : 2741-2744.

Verma, S.C., Ladha, J.K. and Tripathi, A.K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology 91 : 127-141.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., Franken, P. and Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 : 13386-13391.

Walker, R., Powell, A.A. and Seddon, B. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. Journal of Applied Microbiology 84 : 791-801.

Wang, H., Wen, K., Zhao, X., Wang, X., Li, A. and Hong, H. 2009. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. Crop Protection 28 : 634–639.

Wang, S., Hu, T., Jiao, Y., Wei, J. and Cao, K. 2009. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. Frontiers of Agriculture in China 3 : 247-252.

William, E.F. 1982. Principles of Plant Disease Management. New York : Academic Press.

You, F., Wu, J.Z., Huang, B.K. and Qin, L.P. 2009. Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. Biochemical Systematics and Ecology 37 : 162–165.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C. and Gu, Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. Bioresource Technology 101 : 292–297.

Yuan, Z.L., Rao, L.B., Chen, Y.C., Zhang, C.L. and Wu, Y.G. 2011. From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of Abies beshanzuensis. Fungal Biology 115 : 197-213.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

2. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีกสักครู่ จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออกเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ต้มและคนจนน้ำตาล dextrose ละลายจึงนำส่วนผสมน้ำกับวุ้นละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันเติมน้ำกลั่นแทนน้ำที่ขาดหายไป ใส่ขวดหรือหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3. Muller Hinton agar (MHA)

Beef extract	300.0	กรัม
Casamino acids technical	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ชั่งอาหาร MHA 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Tryptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15.0	กรัม
Papaic Digest of Soybean	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ชั่งอาหาร TSA 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. V8 Juice Agar (VA)

V8 Juice	200	มิลลิลิตร
$CaCO_3$	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

6. Malt extract agar (MEA)

Malt extract	17.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

ภาคผนวก ข
การทดสอบปฏิกิริยาแกรมและการสร้างเอนโดสปอร์

1. การทดสอบปฏิกิริยาแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

สารละลาย Hocker's ammonium oxalate crystal violet

สารละลาย A	
Crystral violet	2 กรัม
เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์	20.0 มิลลิลิตร
ละลายสีจนหมด	
สารละลาย B	
Ammonium oxalate	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80.0 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการนำสีไปใช้ควรจะกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วแบ่งใส่ขวดหยดสีชา

สารละลายไอโอดีน

Iodine	1.0 กรัม
Potassium iodine	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	300.0 มิลลิลิตร

เตรียมโดยบด Iodine และ Potassium iodine ให้ละเอียดในโกร่งบดยาที่สะอาด แล้วค่อยๆ ละลายโดยใส่ลงไปในน้ำทีละน้อยจนหมด แล้วแบ่งใส่ขวดสีชา

สารละลายอะซีโตน-แอลกอฮอล์

เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์	100.0 มิลลิลิตร
Acetone	100.0 มิลลิลิตร

ผสมแอลกอฮอล์และอะซีโตนเข้าด้วยกันแล้ว แบ่งใส่ขวดสีชา

สารละลายสี Safranin

Safranin O	2.5 กรัม
เอทธานอล	100.0 มิลลิลิตร

ละลายสีด้วยแอลกอฮอล์จนหมดแล้วเก็บใส่ขวดเป็นสต๊อก เมื่อจะใช้ดูดเอาสต๊อกสีมาจำนวน 10 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แบ่งใส่ขวดหยด

1.2 วิธีการย้อมแกรม

เตรียมสไลด์สำหรับการย้อม แตะน้ำลงบนสไลด์ เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ smear ออกให้เป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง Fix slide ด้วยเปลวไฟโดยหงายด้านที่มีเชื้อขึ้น ผ่านด้านล่างของ slide ไปมาเหนือเปลวไฟ 2-3 ครั้ง (Heat fix) ซึ่งต้องระวังไม่ให้โดนความร้อนมากเกินไปเพราะจะทำให้แตกหรือเสียรูปร่างได้ หยดสารละลาย crystral violet จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วล้างออก ด้วยน้ำ หยดสารละลายไอโอดีน จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วล้างออก ล้างออกโดยค่อยๆ หยดเอทธานอล 95 % เอียงสไลด์ไปมาจนกระทั่งสีน้ำเงินเริ่มจางแล้วจึงรีบล้างออกด้วยน้ำหยด safranin ให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับน้ำด้วยกระดาษหรือผ้าและทิ้งไว้ให้แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว oil โดย gram positive bacteria จะย้อมติดสีม่วงของ crystral violet และ Gram negative bacteria จะย้อมติดสีแดงของ safranin

2. สีย้อมและวิธีการย้อมเอนโดสปอร์

2.1 สีย้อมเอนโดสปอร์

malachite green solution

malachite green	5 กรัม
น้ำกลั่น	95 มิลลิลิตร

ละลาย malachite green ในน้ำกลั่น ปริมาตร 95 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง

safranin solution

safranin	2.5 กรัม
เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลาย safranin ในเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการย้อมเอนโดสปอร์

streak เชื้อแบคทีเรียบนอาการ NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเลา 5 วัน นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมา smear ลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง หยด malachite green 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วม นำสไลด์ไปอังบนไอน้ำร้อน คอยเติม malachite green อย่าให้สีแห้ง เป็นเวลา 10 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำไหล ปล่อยให้แห้ง ย้อมด้วย safranin 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำไหล ซับให้แห้ง ตรวจดูการสร้างเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดย

เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียติดสีแดงของ safranin-O ในขณะที่สปอร์ของแบคทีเรียติดสีเขียวของ malachite green

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียม Mc Farland Standard

barium chloride	0.05 M $BaCl_2$ (1.175% w/v $BaCl_2.H_20$)
sulfuric acid	0.36 M H_2SO_4 (1.00% w/v)

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียม Mc Farland Standard เบอร์ต่างๆ

No.	barium chloride (ml)	sulfuric acid (ml)	x 10^8 CFU/ml
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.10	9.90	3
2	0.20	9.80	6
3	0.30	9.70	9
4	0.40	9.60	12
5	0.50	9.50	15
6	0.60	9.40	18
7	0.70	9.30	21
8	0.80	9.20	24
9	0.90	9.10	27
10	1.00	9.00	30

ภาคผนวก ง

ตารางภาคผนวกที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกแก่สีเขียว

Source	df	SS	MS	F
Treatment	14	27.895	1.992	59.751*
Error	60	2.001	0.033	
Total	74	29.896		

C.V. 33.35%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกสุกสีแดง

Source	df	SS	MS	F
Treatment	14	111.230	7.945	105.891*
Error	60	4.502	0.075	
Total	74	115.732		

C.V. 12.59%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ย acervuli บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	14	1846.904	131.922	103.005*
Error	45	57.633	1.281	
Total	59	1904.537		

C.V. 25.38%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิเคราะห์ความแปรปรวนความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนต้นพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	14	17.429	1.245	11.024*
Error	45	5.082	0.113	
Total	59	22.511		

C.V. 26.57%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนส

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	24.955	4.991	36.054*
Error	24	3.322	0.138	
Total	29	28.277		

C.V. 10.88%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 7 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	2301.175	575.294	272.867*
Error	15	31.625	2.108	
Total	19	2332.800		

C.V. 7.80%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	328.125	82.031	3.890*
Error	15	316.313	21.088	
Total	19	644.438		

C.V. 14.41%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	59642.503	14910.626	8.253*
Error	15	27099.183	1806.612	
Total	19	86741.686		

C.V. 14.77%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* BKSol1.3 และ *Bacillus subtilis* BMSul1.5 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุมการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง (เปอร์เซ็นต์ต้นตาย)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	3720.0000	930.000	148.800*
Error	15	93.750	6.250	
Total	19	3813.750		

C.V. 9.70%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวน ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่า)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	6226.933	1556.733	18.709*
Error	15	1248.138	83.209	
Total	19	7475.070		

C.V. 9.29%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวยุพาภรณ์ เดชโสภา

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620021

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550