

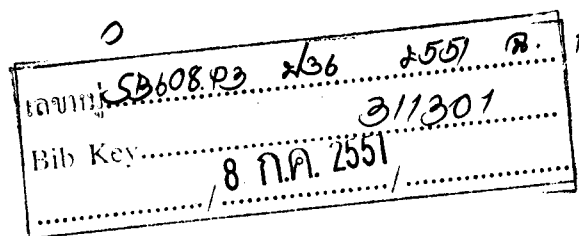


การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี

Biocontrol of Some Chili Fungus Diseases by *Bacillus* spp.

ปฏิมาพร พลอดภัย

Patimaporn Plodpai



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต 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

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

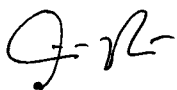
ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวปฎิมาพร ปลอดภัย

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

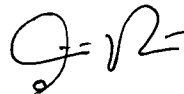
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)



.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์)



.....กรรมการ
(นางนลินี จาริกภากร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา โรคพืชวิทยา



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การใช้เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางสาวปฎิมาพร ปลอดคล้าย
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 607 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริก ด้วยวิธี dilution spread plate ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13, *Cercospora capsici* Ce9 และ *Sclerotium rolfsii* S7 โดยวิธี dual culture plate พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 188 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคของพริกทั้ง 3 ชนิด โดยบางไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 และ *Cer. capsici* Ce9 ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดยวิธี standard blotter plate พบว่าการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแวนดอล *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรค เท่ากับ 41.90 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนินเดียเชื้อรา *C. capsici* C13 และ *Cer. capsici* Ce9 พบว่า สารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 สามารถยับยั้งการงอกของโคนินเดียเชื้อราได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าความยาว germ tube ของโคนินเดียเชื้อราในกรรมวิธีทดสอบ สั้นกว่ากรรมวิธีควบคุม และยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ appressoria นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง หลังเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนผิวพืช และในดินรอบ ๆ รากต้นพริกชี้ฟ้าได้

Thesis Title Biocontrol of Some Chili Fungus Diseases by *Bacillus* spp.
Author Miss Patimaporn Plodpai
Major Program Plant Pathology
Academic Year 2007

ABSTRACT

A total of 607 strains of *Bacillus* spp. were isolated from chili leaves, fruits and rhizospheres by dilution spread plate. All isolates were tested *in vitro* for their inhibitory effect on the mycelial growth of *Colletotrichum capsici* C13, *Cercospora capsici* Ce9 and *Sclerotium rolfsii* S7 by dual culture plates. One hundred and eighty-eight strains of *Bacillus* spp. were antagonistic to all of the tested fungi and some isolates inhibited mycelial growth of *C. capsici* C13 and *Cer. capsici* Ce9 caused up to 100%. The *B. megaterium* SBK5.7 and *Bacillus* sp. SPT41.1.3, the most two effective isolates, were applied for controlling anthracnose on chili spur pepper seeds by standard blotter plate. A mixture of *B. megaterium* SBK5.7 and *Bacillus* sp. SPT41.1.3 effectively reduced the severity of anthracnose on seeds by 41.90% which were significantly as compared with *B. megaterium* SBK5.7 or *Bacillus* sp. SPT41.1.3. The culture filtrate of *Bacillus* spp. were studied for the ability to inhibited conidial germination of *C. capsici* C13 and *Cer. capsici* Ce9. The results showed that a cultured filtrate of *B. megaterium* SBK5.7 and *Bacillus* sp. SPT41.1.3 significantly inhibited conidial germination of the tested fungi compared with the control. Microscopic observation showed that germ tubes of the germinated conidia were shorter than those of the control and also caused abnormal appressoria. *B. megaterium* SBK5.7 and *Bacillus* sp. SPT41.1.3 which are resistant to rifampicin, reduced anthracnose, *Cercospora* leaf spot and root and foot rot of chili spur pepper under field conditions. *Bacillus* spp. could survival on phylloplane and rhizosphere of chili spur pepper at the end of experiment.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางใน
การทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการ
สอบวิทยานิพนธ์ และคุณณิณี จาริกภากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และ
แก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะบัณฑิตวิทยาลัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ และโครงการวิจัย
ประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราของพริก ที่ให้ทุนอุดหนุนใน
การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจำลอง ชูกำเนิด คุณสุภาพ จันทรัตน์ คุณปัทมาพร อินสุวรรณโณ
คุณปฐมพงศ์ วงษ์เลี้ยง และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ
ทั้งด้านวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์ และความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความห่วงใย และกำลังใจใน
การทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช
ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ปฏิมาพร ปลอดภัย

สารบัญ

สารบัญ

หน้า

รายการตาราง	(7)
รายการตารางภาคผนวก	(9)
รายการภาพ	(11)
1. บทนำ	1
บทนำตั้งเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	11
2. วัตถุประสงค์และวิธีการ	12
วัตถุประสงค์	12
วิธีการทดลอง	14
3. ผลและวิจารณ์การทดลอง	30
4. สรุปผลการทดลอง	81
เอกสารอ้างอิง	83
ภาคผนวก	89
ประวัติผู้เขียน	109

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สถานที่เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริก	30
2. จำนวนไอโซเลทของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดิน	42
3. จำนวนไอโซเลทของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13 แบบต่าง ๆ	45
4. จำนวนไอโซเลทของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> S7 แบบต่าง ๆ	48
5. จำนวนไอโซเลทของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9 แบบต่าง ๆ	51
6. สรุปผลการคัดเลือกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13, <i>Cercospora capsici</i> Ce9 และ <i>Sclerotium rolfsii</i> S7 โดยวิธี dual culture plate	53
7. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเข้าทำลายเมล็ดพริกชี้ฟ้าโดยเชื้อ <i>Colletotrichum capsici</i> C13 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม	57
8. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนเดียวเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13	60
9. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนเดียวเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9	64
10. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง	69

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง	73
12. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการยับยั้งการสร้างและการงอกของเมล็ดสเคลอโรเทียม	76

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. การเตรียม Mc Farland Standard เบอร์ต่าง ๆ	92
2. รหัสของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืช และดินจากแปลงเกษตรกร	93
3. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA	95
4. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> S7 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA	100
5. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA	102
6. จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนใบพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน	104
7. จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนผลพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน	104
8. จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังรดดินด้วยเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน	104
9. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนส	105
10. วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13	105
11. วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9	105

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
12. วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของโคนิเดียมเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13	106
13. วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของโคนิเดียมเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9	106
14. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า	106
15. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า	107
16. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา)	107
17. วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า	107
18. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่า)	108
19. วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนเมล็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า	108

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ความเสียหายของผลผลิตพริกที่เกิดจากโรคแอนแทรกโนส	32
2. ลักษณะอาการของโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่เกิดกับส่วนต่าง ๆ ของต้นพริกชี้ฟ้า	34
3. พริกแสดงอาการโรครากและโคนเน่า	35
4. เชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> สาเหตุโรคแอนแทรกโนส	36
5. เชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> สาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา บนอาหาร PDA อายุ 45 วัน	37
6. เชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> สาเหตุโรครากและโคนเน่า	38
7. ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนผลพริกชี้ฟ้า หลังทำการปลูกเชื้อ 5 วัน	39
8. ลักษณะอาการของโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนใบพริกชี้ฟ้า หลังทำการปลูกเชื้อ 7 วัน	40
9. ลักษณะอาการของโรครากและโคนเน่าที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนต้นพริกชี้ฟ้า	41
10. การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธี dilution spread plate	43
11. ปฏิริยาการยับยั้งของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13 และ เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. หลังการทดสอบ 20 วัน	46
12. ปฏิริยาการยับยั้งของเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> S7 และ เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. หลังการทดสอบ 7 วัน	49
13. ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> S7 ที่เกิดจากเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. (100 เท่า)	50
14. ปฏิริยาการยับยั้งของเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9 และ เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. หลังการทดสอบ 45 วัน	52
15. ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. SBK5.7 และ SPT41.1.3 ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร NGA	55

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้า หลังการทดสอบ 11 วัน	58
17. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> C13 (100 เท่า)	62
18. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา <i>Cercospora capsici</i> Ce9 (100 เท่า)	66
19. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริกชี้ฟ้า อายุ 4 เดือน	70
20. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า อายุ 4 เดือน	71
21. ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า อายุ 4 เดือน	74
22. จำนวนประชากรของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนใบพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน	77
23. จำนวนเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริกชี้ฟ้า ตรวจนับด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm	78
24. จำนวนประชากรของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนผลพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน	79
25. จำนวนประชากรของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> SBK5.7 และ <i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังรดดินด้วยเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน	80

บทที่ 1

บทนำ

บทนำด้านเรื่อง

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ มีการเพาะปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก การปลูกพริกอย่างต่อเนื่องมักประสบปัญหาจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds, *C. capsici* (Syd.) Butl. & Bisby, *C. coccodes* (Wallr.) Hughes และ *C. gloeosporioides* Penz. and Sacc.) โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา (*Cercospora capsici* Heald & Wolf) และโรครากและโคนเน่า (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) โดยโรคแอนแทรคโนสก่อให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตทั้งในแปลงปลูก และหลังเก็บเกี่ยว ในระหว่างขนส่งไปจำหน่าย มักแสดงอาการบนผลพริกสุกสีแดง แผลจะยุบตัวลง เมื่ออุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม เชื้อสร้าง acervulus บนแผลให้กำเนิดสปอร์จำนวนมากและแพร่กระจายไปยังผลอื่น ๆ (จิรัสสา มีกลิ่นหอม และคณะ, 2546) ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของพริกมักใช้สารเคมี เช่น คาร์บอกซิน คาร์เบนดาซิม ควินโตซีน ไซเนบ และเบนโนมิล (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2548) ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตและทำให้มีสารเคมีตกค้างปริมาณสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานส่งผลให้ไม่สามารถส่งผลผลิตไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ ปัจจุบันการผลิตพืชในระบบเกษตรที่เหมาะสมและในระบบเกษตรอินทรีย์ ซึ่งหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีมีความสำคัญมากขึ้น ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงมีความจำเป็นเพิ่มขึ้น

เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งหรือทำลายชีวิตของจุลินทรีย์รอบข้าง ซึ่งสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นมีมากถึง 169 ชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม polypeptides เช่น colistin และ polymyxin (*B. polymyxa* (Prazmowski) Mace) ออกฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียลบ bacillomycin F และ mycobacillin (*B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn) ออกฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อรา (Katz and Demain, 1977) รวมทั้งสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้ง่ายต่อการผลิตสูตรผลิตภัณฑ์ (Collins and Jacobsen, 2003) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ (hydrolytic enzyme) เชื้อรา เช่น β -1,3-glucanase (Leelasuphakul *et al.*, 2006) และ chitinase (Singh *et al.*, 2008) และสามารถผลิตสารระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ตรวจเอกสาร

โรคที่เกิดจากเชื้อราในพริก

1. โรคแอนแทรกโนส (anthracnose)

เชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum acutatum*, *C. capsici*, *C. coccodes* และ *C. gloeosporioides*

โรคแอนแทรกโนสจัดเป็นโรคที่สำคัญที่สร้างความเสียหายรุนแรงโรคหนึ่งสำหรับการปลูกพริก โดยพบการระบาดอย่างแพร่หลายในเกือบทุกท้องถิ่นที่มีการปลูกพริก โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงหรือฝนตกชุก เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ทั้งผลสีเขียวและผลสุก

อาการบนผลพริกจะเริ่มจากแผลหรือจุดช้ำเป็นแอ่งยุบลง ลักษณะอาจกลมหรือไม่แน่นอน มีขนาดตั้งแต่จุดเล็กไปจนโตเต็มความกว้างของพริก อาจมีเพียงแผลเดียวหรือหลายแผล แผลเหล่านี้ต่อมาจะแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำพร้อมกับการสร้าง fruiting body ซึ่งเป็นที่เกิดของโคนิเดีย เป็นจุดสีเหลืองส้มหรือสีน้ำตาลดำเป็นวง ๆ เรียงซ้อนกันอยู่ที่แผลดังกล่าว โดยเชื้อจะเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะการเจริญตั้งแต่เริ่มเป็นผลเล็ก ๆ จนโตเต็มที่และสุกแดงแล้ว อย่างไรก็ตามหากเป็นระยะที่ยังอ่อน เซลล์บริเวณแผลซึ่งถูกทำลายเรื่อย ๆ ทำให้เกิดอาการโค้งงอหรือบิดเบี้ยว โดยมีแผลหรือเซลล์ที่ตายอยู่ด้านใน ลักษณะดังกล่าวคล้ายกุ้งแห้งทำให้มีชื่อเรียกดังกล่าว เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนิเดียภายใน fruiting body รูปถ้วยคว่ำ (acervulus) ซึ่งอาจมีขนแข็ง ๆ (setae) สีดำขึ้นแซมอยู่ทั่วไประหว่างโคนิเดีย อย่างไรก็ตามสีของ fruiting body ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จะต่างกันหรือแยกออกจากกันได้ขณะที่ยังอ่อนหรือเริ่มสร้างเท่านั้น เมื่อแก่สีของ fruiting body จะกลายเป็นสีดำเหมือนกันหมด (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537)

การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนส

ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสของพริกสามารถทำได้โดยการปลูกพืชหมุนเวียน การกำจัดวัชพืช การแช่เมล็ดในน้ำร้อน การคลุกเมล็ดด้วยสารเคมีก่อนปลูก การฉีดพ่นด้วยสารเคมี และการควบคุมโดยชีววิธี

ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) แนะนำให้ปลูกพืชอื่นสลับกันอย่างน้อย 3 ปี เพื่อลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคที่สะสมอยู่ในแปลงปลูก และควรเลือกเมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค และหากไม่แน่ใจให้แช่เมล็ดพันธุ์พริกในน้ำอุ่น 49 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลดปริมาณเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ หรือคลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกด้วยสารเคมี เช่น คาร์เบนดาซิม แคปแทน เบนโนมิล

แอนทราโคล และหากมีการระบาดของโรคแอนแทรกโนสในแปลงปลูกให้ฉีดพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม แคปแทน ไซเนบ ไดโพลาเทน เบนโนมิล แอนทราโคล เป็นต้น ร่วมทั้งการกำจัดพืชอาศัยพวกวัชพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อในแปลงปลูกและลดความชื้นบริเวณโคนต้น

การควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกโดยเชื้อ *Bacillus* spp.

จิรศสา มิกลิ้นหอม และคณะ (2546) ได้แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากใบและผลพริกด้วยวิธีการล้างและบดตัวอย่างพืช สามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้จำนวน 210 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดได้ 24 ไอโซเลท และเมื่อนำทุกไอโซเลทไปทดสอบยับยั้งการเกิดแผลบนผลพริกด้วยวิธี detached fruit พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท Lg1 และ HGw13 สามารถลดขนาดแผลลงได้ 73.48 และ 81.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งต่อมา วรณวิไล อินทนู และคณะ (2548) ได้ใช้แบคทีเรียแขวนลอย *B. amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest et al. HGw13, Lg1, Dg13 และ HGw25 ควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพแปลงปลูก พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริก โดยยับยั้งการงอกโคนคืบเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้ และทำให้เส้นใยโป่งออก บิดเป็นเกลียวและเกิดการเปลี่ยนแปลงโปรโตพลาสต์ภายในเส้นใย

จากการศึกษาของวรารณณ์ บุญเกิด และคณะ (2548) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifai T50 และ CB-Pin-01 เมื่อใช้ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* spp. Bo3, DGg13 และ DGg16 ในรูปเชื้อสดมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริกซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เทียบเท่ากับการใช้สารกำจัดเชื้อรา benomyl และยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสสูงกว่าการใช้สารกรองเชื้อ และนอกจากนี้ ในปี 2550 วรารณณ์ บุญเกิด และคณะ พบว่าการใช้เชื้อ *Bacillus* sp. 165 หรือ D13 ร่วมกัน หรือสลับกับเชื้อรา *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริก ได้เท่ากับ 50-94 เปอร์เซ็นต์ และไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *Bacillus* sp. 165 หรือ D13 อย่างเดียว แต่จะมีประสิทธิภาพดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* อย่างเดียว

2. โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา (*Cercospora leaf spot*)

เชื้อสาเหตุโรค *Cercospora capsici*

เป็นโรคที่เกิดขึ้นทั่ว ๆ ไปในเกือบทุกแหล่งที่มีการปลูกพริก แต่ในบางท้องถิ่นที่สภาพแวดล้อมเหมาะสมก็อาจกลายเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงได้ โดยทำให้ใบร่วงหมดทั้งต้น เชื้อสามารถเข้าทำลายใบ ลำต้นและก้านผล ซึ่งแผลมีลักษณะกลมสีน้ำตาลดำขนาด 3-4 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อกลางแผลแห้ง บาง มีสีขาวหรือสีเทา กลางแผลมีราสีเทาดำขึ้นเป็นกระจุก เนื้อเยื่อรอบแผลมีสีเหลือง หากมีแผลจำนวนมากบนใบ แผลขยายใหญ่รวมกันเป็นแผลใหญ่ ทำให้ใบเหลืองทั้งใบ ถ้าเกิดที่ขั้วผลมักทำให้ผลร่วง (อนงค์ จันทรศรีกุล, 2544)

การป้องกันกำจัดโรคใบจุดเชอร์คอสปอรา

เลือกใช้เมล็ดพันธุ์จากแหล่งที่ปราศจากโรค และหากไม่แน่ใจให้แช่ในน้ำอุ่น 49 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือคลุกเมล็ดด้วยสารเคมีก่อนปลูก เพื่อลดปริมาณเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคอยู่เป็นประจำ สามารถป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี เช่น คาร์เบนดาซิม แคปแทน ไซเนบ ไซแรม ไดโฟลาเทน มาเนบ วามีเอส และแอนทราโคล (ศักดิ์สุนทรสิงห์, 2537) รวมทั้งปลูกพืชหมุนเวียนเป็นเวลา 2 ปี เพื่อลดปริมาณเชื้อที่สะสมอยู่ในแปลงปลูก

การควบคุมโรคใบจุดเชอร์คอสปอราโดยเชื้อ *Bacillus* spp.

สำหรับการควบคุมโรค ใบจุดเชอร์คอสปอราของพริกโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ยังไม่มีรายงาน แต่มีรายงานการควบคุมโรคใบจุดเชอร์คอสปอราของชูการ์บีท โดย Collins และ Jacobsen (2003) ซึ่งใช้แบคทีเรียปฏิบัคณ์ *B. subtilis* BacB ควบคุมโรคใบจุดเชอร์คอสปอราของชูการ์บีทที่เกิดจากเชื้อรา *Cer. beticola* Sacc. พบว่าการฉีดพ่นแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* BacB ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือสูงกว่า และไม่เติม β -glucan สามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากที่สุด และพบว่าการฉีดพ่น *B. subtilis* BacB 1-5 วัน ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรคสามารถลดการเกิดโรคได้มากที่สุด ส่วนการใช้ตัวเซลล์กับเอนโดสปอร์ ไม่มีความแตกต่างกันในการลดการเกิดโรคในสภาพแปลงปลูก

3. โรครากและโคนเน่า (root and foot rot)

เชื้อสาเหตุโรค *Sclerotium rolfsii*

รากและโคนต้นพริกที่ถูกเชื้อรา *S. rolfsii* เข้าทำลายจะเน่าเปื่อยเป็นสีน้ำตาลดำ บริเวณโคนต้นมีเส้นใยสีขาวปกคลุม และพบเม็ดสเคลอโรเทียมเกาะอยู่ตามโคนและรากของต้นพริก พริกแสดงอาการใบเหลืองและร่วง ต้นพริกเหี่ยวยืนต้นตาย มักพบต้นพริกตายในขณะที่กำลังเจริญเติบโตเต็มที่หรืออยู่ในระหว่างการผลิดอกออกผล (เฉลิมเกียรติ โภควัฒนา, 2540)

การป้องกันกำจัดโรครากและโคนเน่า

อนงค์ จันทรศรีกุล (2544) แนะนำให้ขุดทำลายต้นที่เป็นโรคแล้วใช้เทอร์ราคลอหรือคาร์บอกซิน ราดลงไปบนดิน รวมทั้งปรับปรุงดินด้วยปูนขาว 200-300 กิโลกรัมต่อไร่ และปุ๋ยอินทรีย์ 2-4 ตันต่อไร่ เพื่อลดปริมาณเชื้อ *S. rolfsii* ในดินและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน

การควบคุมโรครากและโคนเน่าโดยเชื้อ *Bacillus* spp.

สำหรับการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกโดยชีววิธียังไม่มีรายงาน แต่มีรายงานการควบคุมโรคเน่าคอดินของถั่วแดงหลวง ซึ่ง Pleban และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาถึงการใช้เชื้อเอนโดไฟท์ (endophyte) ในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* โดยทำการแยกเชื้อเอนโดไฟท์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวหอมและเมล็ดพันธุ์พืช ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยวิธี dual culture plate พบว่าเชื้อ *B. cereus* Frankland and Frankland, *B. pumilus* Meyer and Gottheil และ *B. subtilis* ซึ่งทำการแยกจากมันสตาร์ด เมล็ดทานตะวัน และหัวหอม ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ในการลดการเกิดโรคเน่าคอดินของถั่วแดงหลวงพบว่าสามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรค ได้ 79 เปอร์เซ็นต์ (*B. cereus*) 72 เปอร์เซ็นต์ (*B. subtilis*) และ 26 เปอร์เซ็นต์ (*B. pumilus*) และตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในพืชหลังการปลูกเชื้อ 72 วัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถมีชีวิตรอดในดินพืชและยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชในสภาพเรือนกระจก

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ลักษณะของเชื้อ *Bacillus* spp.

เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีเซลล์เป็นรูปแท่ง ขนาดเซลล์ 0.5x1.2-2.5x10 ไมโครเมตร สร้างเอนโดสปอร์เมื่ออายุมากขึ้น ซึ่งเอนโดสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกัน

ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ มีแฟลกเจลลารอบตัวจึงทำให้เคลื่อนที่ได้ หายใจแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน (ศุภยางค์ วรุณวิคุณชัย, 2547)

เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลายเนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการได้แก่

1. ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อยับยั้งหรือทำลายชีวิตเชื้อจุลินทรีย์รอบข้าง โดยสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยจะสร้างในช่วงท้ายของ log phase จนถึงช่วง stationary phase สารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นมีมากถึง 169 ชนิด (Slepecky and Hemphill, 1992) จากการศึกษาของ Katz และ Demain ในปี 1977 พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ 68 ชนิด ตัวอย่างเช่น bacilysin, bacillomycin F, difficidin, oxydifficidin, mycobacillin และ subtilin ส่วนเชื้อ *B. brevis* Migula สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ 23 ชนิด ตัวอย่างเช่น gramicidin S, linear gramicidin และ tyrocidin ในขณะที่ bacitracin และ licheniformin ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* (Weigmann) Chester ส่วน colistin และ polymyxin จากเชื้อ *B. polymyxa* สารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม polypeptides และนอกจากนี้ยังพบว่ามีสารกลุ่มอื่น ๆ อีกเช่น aminoglycoside (butirosin) และ phosphorus-containing triene (protocin)

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม polypeptides มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่างกัน เช่น bacitracin ออกฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบชนิดกลม ส่วนสารปฏิชีวนะ colistin, licheniformin, polymyxin และ subtilin ออกฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่ bacillomycin, mycobacillin และ fungistatin ออกฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นเพื่อต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญรอบข้างนั้นประกอบด้วย กลไกการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ไปมีผลยับยั้งขั้นตอนการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และในกรณีของเชื้อราที่เช่นกัน สารปฏิชีวนะจะมีผลยับยั้งการทำงานของ chitin synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อราที่มี chitin เป็นองค์ประกอบ และกลไกการออกฤทธิ์โดยการรบกวนหน้าที่ต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นโดยสารปฏิชีวนะในกลุ่ม polymyxins ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *B. polymyxa* สามารถจับกับ ionized phosphate group ใน phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ lipoprotein ถูกทำลาย (มาลิน จุลศิริ, 2532)

2. สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งทำให้เชื้อ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในสภาพที่เป็นกรดหรือด่างจัด นอกจากนี้ยัง

ทนทานต่อการทำให้แห้งเป็นผง ทำให้ง่ายต่อการผลิตสูตรผลิตภัณฑ์และเมื่อเก็บรักษาแล้วจะยังคงมีชีวิตอยู่ได้หลายปีภายใต้สภาพการเก็บรักษาที่เหมาะสม (Ongena *et al.*, 2005)

3. สามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยเชื้อ *Bacillus* spp. มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการครอบครองและความเหมาะสมของวิธีการนำเชื้อเข้าสู่พืช การที่เชื้อ *Bacillus* spp. สามารถนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ เนื่องจากมีกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ และยังกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคแบบ induced systemic resistance (ISR) หรือ systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งจากการศึกษาของสมใจ พิริยะสาธน์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ (2546) พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากดินปลวกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. และยังมีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญของอะคาเซีย โดยเชื้อแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการเข้าครอบครองรากทำให้ลดความสามารถในการเข้าครอบครองบริเวณรอบ ๆ รากพืชของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่นเดียวกับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดขนุน (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano) Vauterin *et al.*) (รัชฎาวรรณ เฉลิมฉวี และคณะ, 2548) โรคลำต้นเน่า (*S. rolfii*) โรคแอนแทรกคโนส (*C. truncatum* Schwein) และโรคใบด่าง (soybean mosaic virus) โรคฝักซีด (bean pod mottle virus) (สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และคณะ, 2548) ในขณะการศึกษาของชลิดา เล็กสมบุญ และนัฐพร จำปี (2550) พบว่าการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยในแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* E7-17 ก่อนปลูก หรือร่วมกับการราดเชื้อหลังการปลูก สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยพันธุ์ K93-236 ในสภาพแปลงทดลองได้

4. สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ (hydrolytic enzyme) เชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยเฉพาะ β -1,3-glucanase (Leelasuphakul *et al.*, 2006) และ chitinase (Singh *et al.*, 2008) ที่มีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์เชื้อราซึ่งประกอบด้วย β -glucan, chitin และ oligosaccharide ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ จากการศึกษาของ Singh และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* BN1 มีความสามารถในการผลิต β -1,3-glucanase และ chitinase ในปริมาณสูงเพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา *Macrophomina phaseolina* เช่นเดียวกับ *Bacillus* sp. 739 ซึ่งสามารถผลิต β -1,3-glucanase และ chitinase เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (Aktuganov *et al.*, 2007)

5. สามารถผลิตสารระเหย (volatile organic compounds) ประเภทไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) เช่น ethane, propane, propene, isoamyl alcohol และ isoprene โดยเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตสาร isoprene ได้มากถึง 100 เท่า เมื่อเทียบกับแบคทีเรียในกลุ่มอื่น (Sivy *et al.*, 2002)

ซึ่งสารระเหยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Cladosporium oxysporum* Berk. & Curt., *Fusarium oxysporum* Schlecht. ex. Fr., *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, *Pa. variotii* Bainier และ *Pythium afertile* Kanouse et Humphrey (Chaurasia et al., 2005) ซึ่งจากการศึกษาของ สุขล แก้วพรหม (2539) พบว่าสารระเหยที่เชื้อ *B. subtilis* สร้างขึ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., *Rhizoctonia oryzae* Ryker and Gooch และ *R. solani* Kühn สาเหตุโรคของข้าวได้ โดยสารระเหยทำให้โคนินเดียเชื้อราเกิดการบวมและมีผลยับยั้งการงอกของโคนินเดียเชื้อรา

6. การแข่งขัน (competition) แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่ อาหาร และ อากาศ บริเวณรอบ ๆ รากพืช การที่เชื้อ *Bacillus* spp. สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าและดีกว่า ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีเชื้อ *Bacillus* spp. อาศัยอยู่

การควบคุมโรคพืชโดยเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการศึกษาของนลินี จาริกภากร และคณะ (2537) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al. และเชื้อรา *Pyr. grisea*, *Cer. janseana* (Racib.) O. Const., *Curvularia lunata* (Wakk.) Boedijn, *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth, *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & I.C. Hallett และ *A. padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis โดยการสร้างสารปฏิชีวนะและการเป็นปรสิต นอกจากนี้เชื้อ *B. subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์ยังมีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคขอบใบแห้งของข้าว

จากการศึกษาของสุพจน์ กาเซ็ม และ สูดฤดี ประเทืองวงศ์ (2546) พบว่าเชื้อ *B. firmus* Bredemann et Werner KPS44 และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถกระตุ้นการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิเมื่อเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติม bacto-peptone และ dextrose จำนวน 0.8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปรับค่า pH เท่ากับ 7 ในขณะที่สารกรองเชื้อ *B. firmus* ที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เทียบเท่าการใช้สารกำจัดแบคทีเรีย copper hydroxide

จากการศึกษาของพราวมาส เจริญรักษ์ และคณะ (2548) พบว่าแบคทีเรียแวนลอยและสารกรองเชื้อเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของโคนินเดียและการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton

สาเหตุโรคราคำของมะเขือเทศ และพบว่าแบคทีเรียแชนลอยของ *Bacillus* sp. WS16 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรคราคำของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3

จากการศึกษาของบุษราคัม อุดมศักดิ์ และณัฐริมา โฉมิตเจริญกุล (2550) พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. 2G4, 22W10, 20W12, 17G18 และ 20W4 มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศ (*F. oxysporum*) นอกจากนี้เชื้อ *Bacillus* spp. 17G18 ยังสามารถควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวา (*F. solani*) จึงเหมาะสมที่จะในการนำไปทดสอบในระดับแปลงปลูกต่อไป

Hall และ Davis (1990) ได้ทำการศึกษาดังความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อ *B. subtilis* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin และเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Verticillium dahliae* Kleb. สาเหตุโรคเหี่ยวของเมเปิล จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถมีชีวิตอยู่ในดินซิลเวอร์และซูการ์เมเปิล เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งตรวจพบเชื้อ *B. subtilis* บริเวณเนื้อเยื่อท่อน้ำห่างจากตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 30-72 และ 4-5 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะแบคทีเรียที่แยกได้จากลำต้นเมเปิล มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อเดิม จึงกล่าวได้ว่าเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *V. dahliae* สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเคลื่อนที่ไปยังเนื้อเยื่อท่อน้ำที่สร้างขึ้นใหม่ของต้นเมเปิลได้

Sid Ahmed และคณะ (2003) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากรากพริก และนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมดทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora capsici* Leon. และ *R. solani* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลทสามารถสร้างบริเวณใสยับยั้งการเจริญของเชื้อราอย่างน้อย 1 ชนิด และแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่าเซลล์เกิดการ vacuolization และ hypertrophy และการผสมโคติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ในแบคทีเรียแชนลอย *B. subtilis* HS93 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ph. capsici* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *B. licheniformis* LS674 และเชื้อรา *T. harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคตินมีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของเชื้อ *B. subtilis* HS93, *B. licheniformis* LS674 และเชื้อรา *T. harzianum*

ในการปรับปรุงสภาพดินด้วยการเติมโคติน อาจเป็นการป้องกันการเข้าทำลายพืชจากเชื้อสาเหตุโรคเนื่องจากในดินซึ่งเดิมโคตินเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ย่อยโคติน (chitinolytic microorganism) ดังนั้นการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงสัมพันธ์กับการถูกกระตุ้นโดยโคติน ซึ่งจากการทดลองในสภาพเรือนกระจกแสดงให้เห็นว่า การแทรกในโคติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียวสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา *R. solani* และยังเป็นการเพิ่มผลผลิต

พริก ซึ่งอาจเกิดจากไคตินมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สามารถย่อยไคติน หรือ ส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. solani* กล่าวได้ว่า การทำงานของจุลินทรีย์ ปฏิบัณย์ *B. subtilis* HS93, *B. licheniformis* LS674 และเชื้อรา *T. harzianum* ถูกกระตุ้นโดยไคติน ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์ปฏิบัณย์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น

เชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้างไคตินเนสได้ในปริมาณมากในอาหารที่มีการผสมไคติน ซึ่งไคตินที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้ออาจมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัณย์ รวมทั้งเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยการย่อยผนังเซลล์เชื้อราที่ประกอบด้วยไคตินหรืออาจเพิ่มความสามารถในการป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

Ongena และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงการใช้ตัวเซลล์ เอนโดสปอร์ และ semi-purified lipopeptides ของเชื้อ *B. subtilis* M4 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของแตงกวา จากการศึกษาพบว่าในกรรมวิธีควบคุมมีระดับความรุนแรงในการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 55-65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ตัวเซลล์และเอนโดสปอร์สามารถลดพื้นที่การเกิดโรคได้ 29 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การกรรมวิธีที่ใช้ semi-purified lipopeptides ไม่มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของแตงกวา เมื่อตรวจนับจำนวนประชากรเชื้อ *B. subtilis* M4 ที่อาศัยบริเวณรอบรากแตงกวา พบเชื้อปริมาณ $3.6 \pm 1.1 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัม และ $3.0 \pm 0.35 \times 10^6$ เซลล์ต่อกรัม ในกรรมวิธีที่ใช้ตัวเซลล์และเอนโดสปอร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการคลุกเมล็ดมะเขือเทศด้วยตัวเซลล์ของเชื้อ *B. subtilis* M4 สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *Py. aphanidermatum* (Edson) Fitzp. สาเหตุโรคโคนเน่าระดับดินของมะเขือเทศ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ semi-purified lipopeptides แต่การคลุกเมล็ดด้วยเอนโดสปอร์ลดการเกิดโรคได้น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์

Jiang และคณะ (2006) ได้ศึกษาถึงการใช้เชื้อ *B. subtilis* BB11, FH17 และ BF (BB11 ผสมกับ FH17 ในอัตราส่วน 1:1) เพื่อควบคุมโรค Phytophthora blight ของพริกหวาน จากการศึกษาพบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BF มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเท่ากับ 60.3 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตเพิ่มขึ้น 200 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เชื้อ *B. subtilis* BB11 หรือ FH17 เพียงอย่างเดียว ในขณะที่การหมักเชื้อ *B. subtilis* BF กับกากองุ่น เป็นเวลา 3 วัน แล้วโรยลงบนแปลงทดลอง (composting) มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดสูงกว่าในกรรมวิธี mixing, spraying และ watering เนื่องจากอุณหภูมิภายนอกและภายในของกองปุ๋ยหมักอยู่ที่ 25 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในขณะที่อุณหภูมิดังกล่าวจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นที่ไม่สร้างสปอร์ ใน

กรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. subtilis* BF ผสมกับกากองุ่นและนำไปหว่านในแปลงปลูกโดยทันที วิธีนี้จะทำให้การเพิ่มของจำนวนประชากรแบคทีเรียปฏิปักษ์เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ หรืออาจไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเลย เนื่องจากมีอุณหภูมิต่ำและยังมีแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก

Ghai และคณะ (2007) ได้ศึกษาถึงการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อรา *S. rolfsii*, *F. oxysporum* และ *R. solani* สาเหตุโรคโคนเน่า โรคเหี่ยว และโรครากเน่าของทานตะวัน จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. brevis* M166 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีกว่าเชื้อ *B. circulans* Jordon emend Ford M142 และเชื้อ *B. sphaericus* Meyer and Neide A16 ในขณะที่มีเพียงเชื้อ *B. circulans* M142 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* และไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพริก
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราเพื่อควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง และติดตามจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อยู่รอดบนใบพริก ผลพริก และในดิน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ฟลasks ปีกเกอร์ กระบอกตวง haemocytometer แผ่นสไลด์ และ cover slip
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูบ มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากกิบ cork borer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่น ๆ
3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
7. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixture)
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
11. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
12. ตู้เย็น (refrigerator)
13. ไมโครเวฟ (microwave)
14. กล้องถ่ายรูป (camera)
15. วัสดุและอุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ เมล็ดพันธุ์พืชที่ฟ้า อุปกรณ์ระบบน้ำหยด กะบะเพาะกล้า กระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว ป้ายพลาสติก ดินผสม พลาสติกคลุมแปลง ปูระบบน้ำหยดสูตร 15-15-15 และ 13-13-21

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. potato dextrose agar (PDA)
2. nutrient agar (NA)
3. nutrient broth (NB)
4. nutrient glucose agar (NGA)
5. V8 juice agar (VA)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Absa 20
2. agar
3. barium chloride
4. beef extract
5. carbendazim
6. carboxin
7. dextrose
8. ethyl alcohol 70 และ 95 %
9. glucose
10. KOH 3 %
11. lactophenol cotton blue
12. peptone
13. rifampicin
14. sodium carboxy methylcellulose
15. sodium hypochlorite
16. sulphuric acid
17. streptomycin sulfate
18. V8 juice

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างโรคทั้ง 3 ชนิด และตัวอย่างใบพริก ผลพริกและดิน

1.1 เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าเพื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างโรคระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ในพื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส พัทลุง และสงขลา โดยเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแปลงละ 5 ตัวอย่าง ใส่ในซองกระดาษ และนำตัวอย่างพริกดังกล่าวมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค ภายใน 2 วัน

1.2 เก็บตัวอย่างพืชและดิน

เก็บตัวอย่างใบพริก ผลพริกและดิน เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด ทำการเก็บตัวอย่างพืชและดิน ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2550 จากแปลงปลูกพริกในพื้นที่จังหวัดข้างต้น โดยเก็บ 1) ตัวอย่างผลและใบพริกที่ปกติ 2) ตัวอย่างผลและใบพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนสและโรคใบจุดเซอร์คอสปอราตามลำดับ และ 3) ตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกโดยเลือกเก็บตัวอย่างดินลึก 0-15 เซนติเมตร จากบริเวณโคนต้นพริกที่ไม่แสดงอาการโรคทั้ง 3 ชนิด สุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกพริกพันธุ์ต่าง ๆ ของเกษตรกร แปลงละ 5 จุด ๆ 3 กรัม และนำตัวอย่างพืชและดินมาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ภายใน 2 วัน

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า

2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส

นำตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส จากข้อ 1.1 มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยนำผลพริกมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มในกล่องพลาสติกขึ้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ทำการแยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation โดยเขี่ยโคนเดี่ยวเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Sutton (1992) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารแข็ง เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคต่อไป

2.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

นำตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอราจากข้อ 1.1 มาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยตัดชิ้นส่วนใบพริกที่โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ให้มีเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่เป็นโรคเชื่อมต่อกัน ขนาดชิ้นละ 1x1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่ตัดมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที บ่มเชื้อโดยวิธี standard blotter plate โดยวางเนื้อเยื่อพืชในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบลักษณะการเจริญและการสร้างโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular และ compound และทำการแยกเชื้อราโดยวิธี single spore isolation โดยเขี่ยโคนิเดียเชื้อรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางบนอาหาร PDA และ V8 juice agar (VA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Ellis (1971) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารแข็ง เพื่อใช้ในการพิสูจน์ต่อไป

2.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า

นำตัวอย่างดินพริกที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่าจากข้อ 1.1 มาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยนำเมล็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนดินพริก แช่ใน sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อ วางเมล็ดสเคลอโรเทียมบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการของ Punja (1985) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารแข็ง เพื่อใช้ในการพิสูจน์โรคต่อไป

2.4 การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค

2.4.1 การพิสูจน์โรคแอนแทรคโนส

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่แยกได้จากข้อ 2.1 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา วางชิ้นรูนบนผลพริกซ์ฟ้าปกติไม่แสดงอาการโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ ทำแผลด้วยเข็มเขี่ย ทำการทดสอบไอโซเลทละ 4 ผล จากนั้นนำไปบ่มในกล่องพลาสติกชั้นที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน ทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

2.4.2 การพิสูจน์โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเชอร์คอสปอราที่แยกได้จากข้อ 2.2 บนอาหาร VA เป็นเวลา 12 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา นำไปวางบนใบพริกที่ปกติและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการปลูกเชื้อโดยใช้เข็มเย็บทำแผล จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่มีละอองน้ำปรอมอยู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน ทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

2.4.3 การพิสูจน์โรครากและโคนเน่า

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าที่แยกได้จากข้อ 2.3 ตามวิธีการในข้อ 2.4.1 นำชิ้นส่วนไปวางบริเวณโคนต้นพริก อายุ 2 เดือน ใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน ทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และแยกเชื้อราซ้ำอีกครั้ง

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

3.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดิน

นำส่วนของใบพริก ผลพริก และดินมาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate โดยนำตัวอย่างผลและใบพริกมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และตัวอย่างดินที่ผึ่งแห้ง ตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทนความร้อนและกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อ *Bacillus* spp. นำตัวอย่างไปเจือจางเป็นลำดับสิบ (10-fold dilution) ได้สารแขวนลอยตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2} - 10^{-6} เท่า กระจายแขวนลอยปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *C. capsici* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นจำนวน 5 จุด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เลือกเก็บโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ทดสอบปฏิกิริยาแกรม และการสร้างเอนโดสปอร์ตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และทำการเก็บเชื้อ *Bacillus* spp. ที่บริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงที่มีอาหาร NA (nutrient agar) เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici*, *Cer. capsici* และ *S. rolfii* ต่อไป

ให้รหัสเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลท โดยอักษรตัวแรกมาจากชนิดของตัวอย่าง อักษรตัวที่ 2 เป็นสถานที่เก็บตัวอย่าง อักษรตัวที่ 3 เป็นหมายเลขตัวอย่าง แล้วตามด้วยลำดับที่ของไอโซเลท เช่น เชื้อ *Bacillus* spp. SBK5.7 หมายถึง เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริก ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากอำเภอบางกล่ำ จังหวัดสงขลา ในแหล่งที่ 5 และเป็นไอโซเลทที่ 7 ที่แยกได้ด้วยวิธี dilution spread plate

3.2 คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

3.2.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์รี่คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. capsici*, *Cer. capsici* และ *S. rolfsii* ตามลำดับ โดยนำเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อรา *C. capsici* เป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่เชื้อรา *Cer. capsici* และ *S. rolfsii* ใช้เวลาในการบ่มเชื้อ 7 และ 2 วัน ตามลำดับ

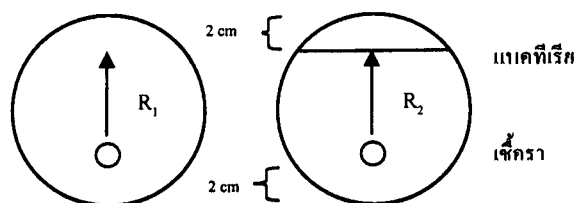
3.2.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. โดยนำเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งแยกได้จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก ด้วยวิธี dual culture plate โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* นำไปวางห่างจากขอบจานอาหาร PDA เท่ากับ 2 เซนติเมตร นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มาฉีดยาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตรงข้ามชิ้นวุ้นเชื้อราโดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ส่วนในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (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

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริก เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.3 โดยใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 71 เปอร์เซ็นต์ มาใช้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตรงข้ามชั้นวันเชื้อราโดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ส่วนในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cercospora capsici*

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริก เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.3 โดยใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* มาใช้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตรงข้ามชั้นวันเชื้อราโดยห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ส่วนในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลททำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici*, *Cer. capsici* และ *S. rolfsii* โดยทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการสร้างสารยับยั้ง หรือการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหารเพื่อทดสอบต่อไป

3.3 การทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อ *Bacillus* spp.

3.3.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici*, *Cer. capsici* และ *S. rolfsii* โดยย้ายเชื้อ *Bacillus* spp. จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nutrient broth (NB) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5

3.3.2 วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยใช้ cotton swab ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จุ่มแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 1 และเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร NGA อย่างสม่ำเสมอ นำแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 3 ที่ตัดเป็นแผ่นกลม (disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนผิวหน้าอาหาร NGA จำนวน 3 ชิ้นต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ หยดแบคทีเรียแขวนลอยสายพันธุ์ที่ 2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน disc บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ สังเกตการเกิดหรือไม่เกิดวงใสระหว่างเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์

3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) และส่งเชื้อ *Bacillus* spp. ไปจำแนกชนิดที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อด้วยเครื่อง Biolog Microlog System, Release 4.2

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเข้าทำลายของโรคแอนแทรกโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า

3.5.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

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

3.5.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 1+2 (สายพันธุ์ที่ 1 ผสม สายพันธุ์ที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1) ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 รวมทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. บนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5 และเติมสารเกาะยึด sodium carboxy methylcellulose 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร (อมรรัตน์ ชุมทอง, 2547)

3.5.3 วิธีการทดสอบ

จากเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.2 จำนวน 2 สายพันธุ์ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าด้วยวิธี standard blotter plate โดยทำการปลูกเชื้อรา *C. capsici* บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า ด้วยการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. capsici* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มในกล่องพลาสติกชื้น เป็นเวลา 2 วัน นำเมล็ดพริกชี้ฟ้าที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *C. capsici* แช่ในแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที นำเมล็ดพริกชี้ฟ้า จำนวน 25 เมล็ด วางในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง near ultra violet เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ๆ ละ 25 เมล็ด

กรรมวิธีที่ 1 : แซ่เมล็ดพริกในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 : แซ่เมล็ดพริกในเบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 : แซ่เมล็ดพริกในเบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 : แซ่เมล็ดพริกในเบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 1+2

กรรมวิธีที่ 5 : แซ่เมล็ดพริกในคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm

ทำการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรกโนสของเมล็ดพริกชี้ฟ้าหลังทำการปลูกเชื้อรา *C. capsici* เป็นเวลา 9 วัน โดยนับจำนวน acervulus ที่เจริญอยู่บนเมล็ดพริกชี้ฟ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular และให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคแอนแทรกโนสดังนี้

ระดับ 0 : ไม่พบการเจริญของ acervulus บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า

ระดับ 1 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 1-5 acervulus ต่อเมล็ด

ระดับ 2 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 6-10 acervulus ต่อเมล็ด

ระดับ 3 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 11-15 acervulus ต่อเมล็ด

ระดับ 4 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 16-20 acervulus ต่อเมล็ด

ระดับ 5 : acervulus เจริญบนเมล็ดพริกชี้ฟ้ามากกว่า 21 acervulus ต่อเมล็ด

นำค่าระดับความรุนแรงที่ประเมินได้ไปคำนวณหาค่าดัชนีการเกิดโรคและการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนส (พราวมาส เจริญรักษ์ และคณะ, 2548) จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดพริกชี้ฟ้า} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา

3.6.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. capsici* ด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน เตรียมเป็นสปอร์แขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ นับโคนิเดียด้วย haemocytometer และปรับระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Cer. capsici* จากใบพริกแสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา ซึ่งบ่มไว้ในกล่องขึ้นเป็นเวลา 1 วัน โดยใช้ฟุ้งกันจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้ง ปัดโคนิเดียของเชื้อราบริเวณบนใบลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ นับโคนิเดียด้วย haemocytometer และปรับระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.6.2 การเตรียมสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp.

เตรียมสารกรองโดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 1+2 (สายพันธุ์ที่ 1 ผสม สายพันธุ์ที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1) ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 บนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง เชื้อโคโคนิเดีย ๆ มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติม bacto-peptone และ dextrose จำนวน 0.8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปรับค่า pH เท่ากับ 7 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (สุพจน์ กาเข้ม และสุคฤดี ประเทืองวงศ์, 2546) นำไปเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใส กรองเซลล์เบคทีเรียด้วย milipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เจือจางสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยอัตราส่วนสารกรองเชื้อต่อน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32

3.6.3 การทดสอบการยับยั้งการงอกของโคนิเดีย

หยคน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ สารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. และคาร์เบนดาซิม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสไลด์หลุม จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. capsici* หรือ *Cer. capsici* ปริมาตรเท่ากันลงไป เกลี่ยให้ทั่ว บ่มในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสไลด์มาข้อมด้วย lactophenol cotton blue นับจำนวนโคนิเดียที่งอก โดยกำหนดว่าการงอกคือ เมื่อโคนิเดียมีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างของโคนิเดีย (Fravel and Spurr, 1977) และวัดความยาวของ germ tube เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 23 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 โคนิเดีย

3.7 การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin

จากเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกไว้ในข้อ 3.2 นำมาศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin (ประจวบ บุตรศาสตร์และคณะ, 2548) เพื่อใช้ในการติดตามประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริก ผลพริก และดินปลูกพริก โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จำนวน 2 สายพันธุ์บนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายเชื้อ *Bacillus* spp. ลงบนอาหาร NGA ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, ..., 100 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญได้ย้ายลงบนอาหาร NGA ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น จนถึงระดับความเข้มข้น 100 ppm เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm กับเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์เดิม และทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี dual culture plate

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

4.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* spp.

เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ผ่านการพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm (ข้อ 3.7) จำนวน 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 1+2) โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. บนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยด้วยการเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแขวนลอยให้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5 และเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพ (Absa 80) จำนวน 0.4 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร

4.2 การเตรียมพืช

เตรียมต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แช่เมล็ดพริกในแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์เบนดาซิม (1,600 ppm) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที เพาะเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าในกระบะเพาะย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ลงในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว โดยปลูกเป็นแถวเดี่ยว ระยะห่างระหว่างต้น 0.7 เมตร ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร จำนวนทั้งสิ้น 336 ต้น หลังจากย้าย

ปลูก 15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในระบบน้ำหยด ทุก 7 วัน ในอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และเมื่อเริ่มเก็บเกี่ยวใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ผสมกับ 13-13-21 (อัตรา 1:1) ทุก 5 วัน (นิรนาม, 2550)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดเชอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดเชอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า ซึ่งเกิดการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคตามธรรมชาติ (natural infection) เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อต้น ฉีดพ่นทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 : ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 : ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 : ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 : ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1+2

กรรมวิธีที่ 5 : ฉีดพ่นด้วยคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm

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

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส

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

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

ระดับ 3 : แสดงอาการโรค 50-75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (3 แผลต่อผล)

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

ทำการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า เมื่อเสร็จสิ้นการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าตามกรรมวิธีข้างต้น ด้วยวิธี descriptive area กับใบพริกชี้ฟ้าทั้งต้น โดยให้ระดับความรุนแรงดังนี้

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการโรค

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

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

ระดับ 3 : แสดงอาการโรค 50-75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (4-5 แผลต่อใบ)

ระดับ 4 : แสดงอาการโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น (มากกว่า 5 แผลต่อใบ)

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค มาคำนวณค่าดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค (พราวมาส เจริญรักษ์ และคณะ, 2548) จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนต้น} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

4.4.1 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริก โดยเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.3 บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* เจริญอยู่บนผิวหน้าให้มีขนาด 2 x 2 เซนติเมตร และทำการปลูกเชื้อด้วยเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* อัตราส่วน 15 กรัมต่อต้น โดยคลุกเส้นใยสดกับดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า

4.4.2 การทดสอบ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน โดยทำการรดดินบริเวณโคนต้น

พริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแฆวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์บอกซิน และน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อต้น ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 2 เดือน และปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยนำเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* คลุกดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า อัตราส่วน 15 กรัมต่อต้น ใช้พลาสติกใสคลุมโคนต้นพริกชี้ฟ้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 : ราคินด้วยน้ำกลั่น

กรรมวิธีที่ 2 : ราคินด้วยแบคทีเรียแฆวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 : ราคินด้วยแบคทีเรียแฆวนลอย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 : ราคินด้วยแบคทีเรียแฆวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1+2

กรรมวิธีที่ 5 : ราคินด้วยคาร์บอกซิน ที่ระดับความเข้มข้น 375 ppm

ทำการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า เมื่อกรรมวิธีที่ราคินด้วยน้ำกลั่นมีต้นพริกชี้ฟ้าตาย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ระดับคะแนนความรุนแรงในการเกิดโรคดังนี้

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการเหี่ยว

ระดับ 1 : แสดงอาการเหี่ยว 1-25 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น

ระดับ 2 : แสดงอาการเหี่ยว 26-50 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น

ระดับ 3 : แสดงอาการเหี่ยว 50-75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น

ระดับ 4 : แสดงอาการเหี่ยว 76-100 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค มาคำนวณค่าดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนต้น} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

นับจำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมที่เชื้อรา *S. rolfii* สร้างขึ้นบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังรดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1+2 คาร์บอกซิน และน้ำกลั่น โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า กระจายละ 20 กรัม เติม hydrogen peroxide ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (Naiki and Akimoto, 1976; อ้างโดย Miller and Webster, 2001) และนับจำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมที่ลอย และทดสอบการเจริญเป็นเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* ของเม็ดสเคลอโรเทียม โดยนำเม็ดสเคลอโรเทียมดังกล่าว แช่ใน sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อ วางเลี้ยงบนอาหาร PDA จำนวน 5 เม็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมที่งอกเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่รดดินด้วยน้ำกลั่น นำค่าที่ได้มา คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเม็ดสเคลอโรเทียม วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

4.5 การติดตามประชากร *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริก ผลพริก และดินปลูกพริก

ทำการติดตามประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนต้นพริกชี้ฟ้า และในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า โดยนำตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า ที่ผ่านการฉีดพ่น หรือรดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาตรวจนับจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate โดยนำตัวอย่างใบพริก และผลพริก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และดินที่ผึ่งแห้ง ตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร (อัตราส่วนตัวอย่างพืช 1 กรัมต่อน้ำ 9 มิลลิลิตร) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับสิบ ได้สารแขวนลอยตัวอย่าง 10^{-1} - 10^{-4} เท่า คูดสารแขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยสารแขวนลอยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารอย่างสม่ำเสมอ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีเชื้อ *Bacillus* spp. ในระดับการเจือจางที่มีเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี (Gary, 2007) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมแล้วคำนวณหาจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อสารแขวนลอย 1 มิลลิลิตร จากสูตร

$$\text{จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร (cfu/ml)} = \left[\frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{ส่วนกลับของระดับการเจือจาง}}{\text{ปริมาตรสารแขวนลอย}} \right]$$

ทำการติดตามประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถชีวิตรอดอยู่บนต้นพริกชี้ฟ้าและในดิน บริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 งานอาหารเลี้ยงเชื้อ

บทที่ 3 ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. เก็บตัวอย่างโรคทั้ง 3 ชนิด และตัวอย่างใบพริก ผลพริกและดิน

1.1 เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกโนส

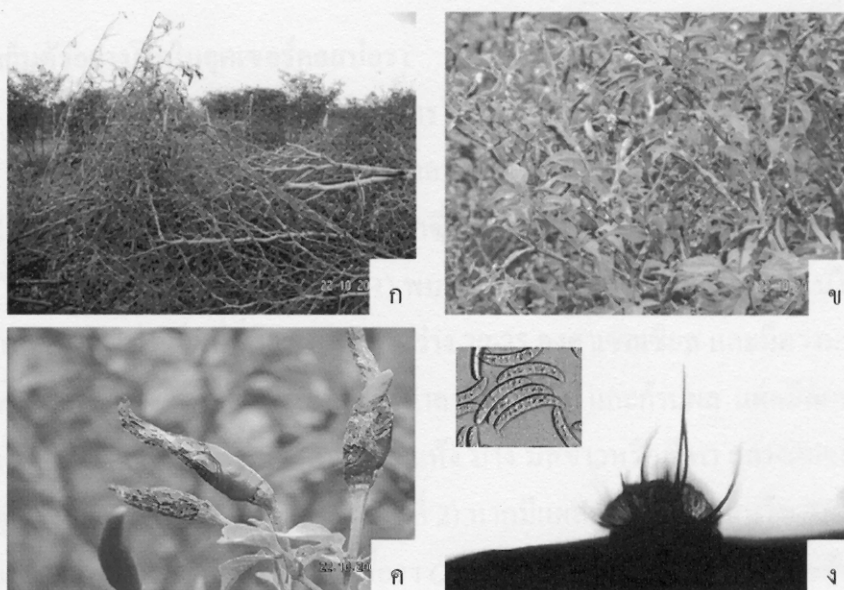
เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการ โรคแอนแทรกโนส เพื่อนำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างโรกระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ในพื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส พัทลุง และสงขลา ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกโนสจากแปลงปลูกพริกของเกษตรกรได้จำนวน 32 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่าง โรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริก

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างโรค		
	แอนแทรกโนส	ใบจุดเซอร์คอสปอรา	รากและโคนเน่า
ชุมพร	4	8	1
ตรัง	4	9	2
นครศรีธรรมราช	4	13	2
นราธิวาส	2	4	0
พัทลุง	3	5	0
สงขลา	15	33	4
รวม	32	72	9

จากตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการ โรคแอนแทรกโนส จำนวน 32 ตัวอย่าง สามารถแบ่งลักษณะอาการโรคได้ 2 กลุ่ม คือ ลักษณะแผลกลมหรือรูปร่างไม่แน่นอน แผลยุบลง มีสีน้ำตาล บริเวณกลางแผลพบการสร้าง acervulus สีดำ และพบกลุ่มโคนเน่าสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 1) สามารถเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ได้ในแปลงปลูกพริกในพื้นที่จังหวัดสงขลา ชุมพร ตรัง และ นครศรีธรรมราช จำนวน 30 ตัวอย่าง และกลุ่มลักษณะแผลยาวรี แผลยุบตัวลง บริเวณกลางแผลพบ

กลุ่มโคนิเดียมสีส้ม ซึ่งลักษณะอาการเช่นนี้พบเพียง 2 ตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสงขลาเท่านั้น สอดคล้องกับลักษณะอาการที่ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) ได้รายงานไว้ว่าลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสที่บริเวณกลางแผลพบการสร้าง setae ภายใน acervulus และมีกลุ่มโคนิเดียมสีน้ำตาลดำนั้น เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* ส่วนลักษณะอาการที่บริเวณกลางแผลพบกลุ่มโคนิเดียมสีส้ม แต่ไม่พบการสร้าง setae ภายใน acervulus เป็นลักษณะอาการที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อราดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสกับพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ แก้วมังกร ผักเหียง มะม่วง ทูเรียน ขางพารา หน่อกล้วย ส้ม (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2548) สตรอเบอร์รี่ (Paredes and Muñoz, 2002) กาแฟ โอโวกาโด องุ่น แอปเปิ้ล อัลมอนต์ (Sanders and Korsten, 2002) มันเสา (Ekefan *et al.*, 2000) มะละกอ (Alvarez and Nishijima, 1987) ทั้งยังก่อให้เกิดโรคใบร่วงของขางพารา (Guyot *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อรา *C. capsici* มีรายงานว่าก่อให้เกิดโรค brown blotch ของถั่วพุ่ม (Owolade *et al.*, 2006) โรคแอนแทรกโนสของฝ้าย ถั่วแดงหลวง ถั่วพลู (Pring *et al.*, 1995) และมะเขือเทศ (Okoli and Erinle, 2003) จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค พบว่าการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรกโนสในพื้นที่ปลูกพริกทางภาคใต้โดยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. capsici* ดังนั้นจึงนำตัวอย่างผลพริกดังกล่าวมาทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคในขั้นตอนต่อไป

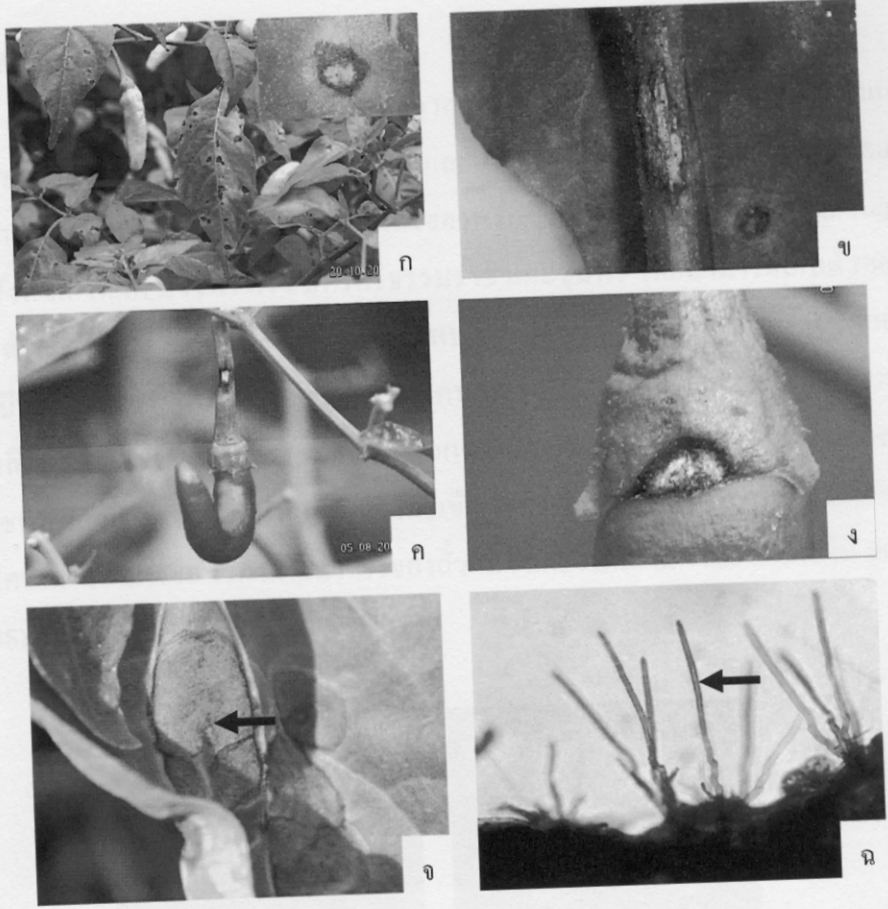


ภาพที่ 1 ความเสียหายของผลผลิตพริกที่เกิดจากโรคแอนแทรกคโนส

- (ก) การตัดทำลายต้นพริกที่เป็นโรคแอนแทรกคโนสของเกษตรกร
- (ข) การแพร่ระบาดของโรคซึ่งสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตพริกทั้งต้น
- (ค) เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะการเจริญ
- (ง) ลักษณะของ acervulus และ โคนิเดียมของเชื้อรา *C. capsici* (400 เท่า)

1.2 เก็บตัวอย่างโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา เพื่อนำมาแยกเชื้อรา *Cer. capsici* โดยทำการเก็บตัวอย่างโรคในช่วงเวลา และสถานที่เดียวกับการเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนส โดยโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Cer. capsici* สามารถเก็บตัวอย่างโรคได้จำนวน 72 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) พบการแพร่ระบาดของโรคโดยทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกพริก โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิระหว่าง 20-25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศสูง เชื้อรา *Cer. capsici* สามารถเข้าทำลายใบ ลำต้น และก้านผล แผลมีลักษณะกลม สีน้ำตาลดำ ขนาด 3-4 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อกลางแผลแห้ง บาง มีสีขาวหรือสีเทา กลางแผลมีราสีเทาดำ ขึ้นเป็นกระจุก เนื้อเยื่อรอบแผลมีสีเหลือง (ภาพที่ 2) หากมีแผลจำนวนมากบนใบ แผลขยายใหญ่ รวมกันเป็นแผลใหญ่ ทำให้ใบเหลืองทั้งใบ เชื้อรา *Cercospora* sp. สามารถเข้าทำลายพืชสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ชูการ์บีท (*Cer. beticola*) (Collins and Jacobsen, 2003) ข้าว (*Cer. janseana*) ข้าวฟ่าง (*Cer. sorghi* Ellis & Everh.) ถั่วเขียว (*Cer. canescens* Ellis and Martin) ถั่วฝักยาว (*Cer. cruenta* Sacc.) ถั่วลิสง (*Cer. arachidicola* Hori และ *Cer. canescens* Ellis and Martin) ถั่วเหลือง (*Cer. kikuchii* (Matsumoto and Tomoyasii) M.W. Garder) และยาสูบ (*Cer. nicotianae* Ellis & Everh.) (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2548)

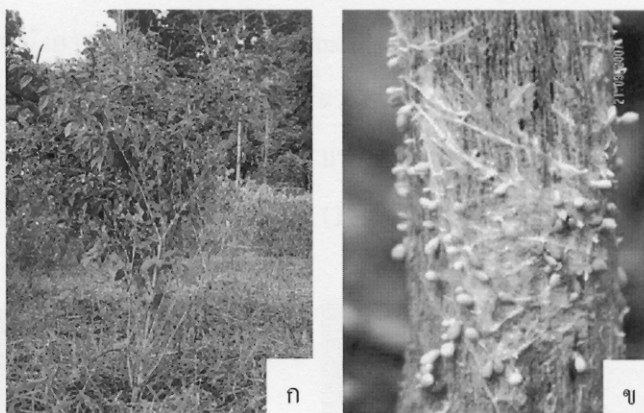


ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดเซอร์คอสพอราที่เกิดกับส่วนต่าง ๆ ของต้นพริกชี้ฟ้า

- (ก) อาการที่ใบ เกิดแผลกลมสีน้ำตาลดำ เนื้อเยื่อกลางแผลมีสีขาวเทา รอบแผลสีเหลือง
- (ข) อาการ โรคใบจุดเซอร์คอสพอราบนกิ่งก้าน
- (ค) อาการ โรคบนขั้วผล
- (ง) อาการ โรคบนกลีบเลี้ยง
- (จ) บริเวณแผลมีกลุ่ม โคนิเดียมสีเทาดำขึ้นเป็นกระจุก
- (ฉ) ลักษณะ โคนิเดียม (สรชี้) และ โคนิดิโอฟอร์ของเชื้อรา *Cercospora capsici* (100 เท่า)

1.3 เก็บตัวอย่างโรครากและโคนเน่า

เก็บตัวอย่างต้นพริกที่แสดงอาการ โรครากและโคนเน่า เพื่อนำมาแยกเชื้อรา *S. rolfsii* โดยทำการเก็บตัวอย่างโรคในช่วงเวลา และสถานที่เดียวกับการเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนส จากการสำรวจพบว่าโรครากและโคนเน่าของพริกซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *S. rolfsii* พบในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ สงขลา ตรัง นครศรีธรรมราช และชุมพร โดยสามารถเก็บตัวอย่างโรคได้จำนวน 9 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ลักษณะอาการที่พบ เช่น โคนต้นพริกปริแตก แผลยุบตัวลง เนื้อเยื่อใต้เปลือกมีสีน้ำตาลดำ มีเส้นใยราสีขาวปกคลุมโคนต้น พบเม็ดสเคลอโรเทียมเกาะอยู่ตามโคนและราก ใบเหลือง ร่วง และยืนต้นตาย (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *S. rolfsii* สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด เช่น โรคน้ำคอดินของมะเขือ โรครากเน่าของแครอต ถั่ว และเข้อร์บีร่า โรครากและโคนเน่าของมะเขือ โรคโคนเน่าขาวของถั่วลิสง และโรคน้ำแห้งของกล้วยไม้ (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2548)



ภาพที่ 3 พริกแสดงอาการโรครากและโคนเน่า

- (ก) เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายบริเวณ โคนต้นและราก ทำให้พริกแสดงอาการเหี่ยว และยืนต้นตาย
- (ข) เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สร้างเม็ดสเคลอโรเทียมเกาะบริเวณ โคนต้นพริก

1.4 เก็บตัวอย่างพืชและดิน

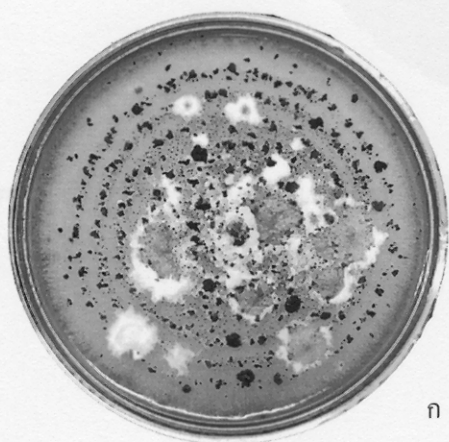
เก็บตัวอย่างผลพริก ใบพริกและดินรอบ ๆ โคนต้นพริก เพื่อนำมาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า ทำการเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2550 จากแปลงปลูกพริก จี๋หนู พริกมัน และพริกชี้ฟ้าของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส

พัทลุง และสงขลา สามารถเก็บตัวอย่างผลพริกปกติ จำนวน 55 ตัวอย่าง ผลพริกแสดงอาการโรคแอนแทรกโนส จำนวน 32 ตัวอย่าง ใบพริกปกติได้ จำนวน 83 ตัวอย่าง ใบพริกแสดงอาการโรคใบจุดเชอร์คอสปอรา จำนวน 72 ตัวอย่าง และดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้น จำนวน 156 ตัวอย่าง และนำตัวอย่างพืช และดินมาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate

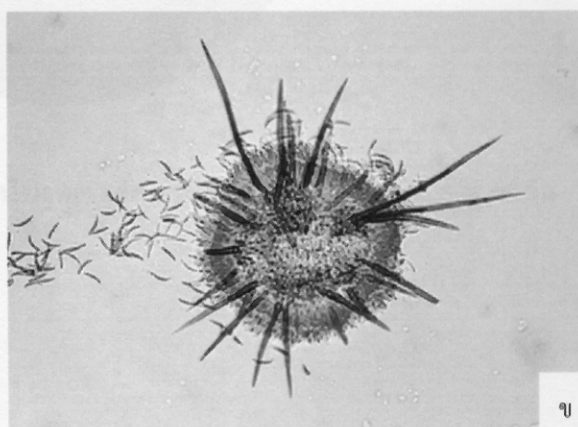
2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเชอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า

2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส

เมื่อนำผลพริกที่มีลักษณะอาการแผลยุบตัวลง บริเวณกลางแผลพบการสร้าง acervulus สีดำและกลุ่มโคนิเดียสีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่พบโดยส่วนใหญ่ในพื้นที่ปลูกพริกทางภาคใต้ มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสโดยวิธี single spore isolation โดยการเชื้อโคนิเดียเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางเลี้ยงบนอาหาร PDA ได้เชื้อราที่มีเส้นใยสีเทา มีผนังกัน พูเล็กน้อย มีการสร้าง acervulus เดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียงซ้อนกันเป็นวงกระจายทั่วบนผิวหน้าอาหาร ภายใน acervulus มี setae สีน้ำตาลดำฐานโป่ง ปลายเรียวแหลม โคนิเดียมีสีครีมอ่อนหรือไม่มีสี รูปพระจันทร์เสี้ยว ไม่มีผนังกัน เชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 12 วัน (ภาพที่ 4) สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสได้ทั้งสิ้น 22 ไอโซเลท และเมื่อทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Sutton (1992) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *C. capsici*



ก



ข

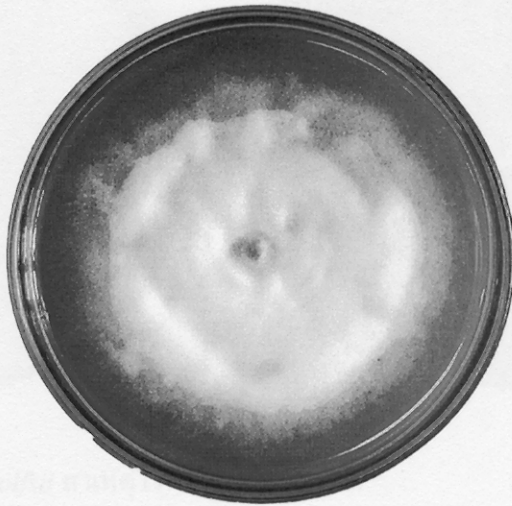
ภาพที่ 4 เชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

(ก) โคนิเชียเชื้อรา *C. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 12 วัน

(ข) acervulus และโคนิเดียของเชื้อรา *C. capsici* (100 เท่า)

2.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเชอร์คอสปอรา

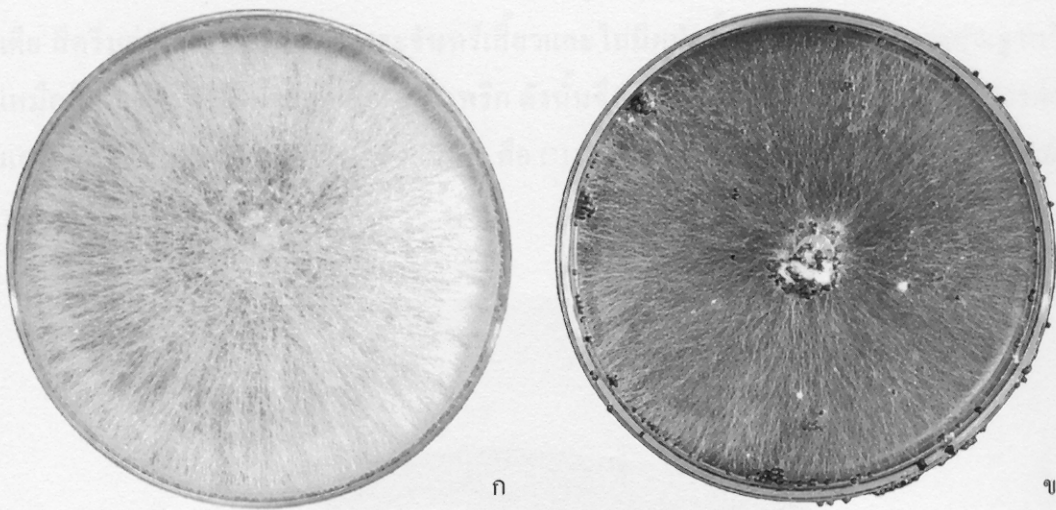
เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเชอร์คอสปอรา ซึ่งบ่มตัวอย่างโรคโดยวิธี standard blotter plate และแยกเชื้อราโดยวิธี single spore isolation โดยเขี่ยโคนิเดียมเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo binocular วางบนอาหาร PDA และ VA พบว่าได้เชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวเทา มีผนังกัน มีการสร้างสี (pigment) ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการสร้างโคนิเดียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 45 วัน (ภาพที่ 5) สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเชอร์คอสปอราได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท และเมื่อทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Ellis (1971) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *Cer. capsici*



ภาพที่ 5 เชื้อรา *Cercospora capsici* สาเหตุโรคใบจุดเชอร์คอสปอรา บนอาหาร PDA อายุ 45 วัน

2.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า

เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่า โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดสเคลอโรเทียม ด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ แล้ววางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มีเส้นใยมีสีขาวหยาบ มีผนังกัน สร้างเมล็ดสเคลอโรเทียมอัดตัวแน่นสีน้ำตาล เชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 3 วัน (ภาพที่ 6) สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าได้ทั้งสิ้น 9 ไอโซเลท และเมื่อทำการจำแนกเชื้อราตามวิธีการของ Punja (1985) พบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *S. rolfsii*



ภาพที่ 6 เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า

(ก) โคโลนีเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 3 วัน

(ข) เชื้อรา *S. rolfsii* สร้างเมล็ดสเคลอโรเทียม เมื่ออายุ 10 วัน

2.4 การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulate)

2.4.1 การพิสูจน์โรคแอนแทรกซิส

เมื่อนำเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกซิสจำนวน 30 ไอโซเลท ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน มาทำการปลูกเชื้อบนผลพริกชี้ฟ้าปกติไม่แสดงอาการโรค พบว่าผลพริกชี้ฟ้าที่ทำการปลูกเชื้อแสดงอาการจุดแผลสีน้ำตาลดำ ตรงกลางแผลมีการสร้าง acervulus สีดำเรียงเป็นวงเป็นชั้น ๆ และมีกลุ่มโคนิเดียสีน้ำตาลดำกระจายอยู่บริเวณกลางแผล (ภาพที่ 7) และเมื่อทำการแยกเชื้อจากผลพริกดังกล่าวซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี single spore isolation พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง มีเส้นใยสีเทา มีผนังกันและฟูเล็กน้อย มีการสร้าง acervulus และ setae โคนิเดีย สีครีมอ่อนหรือไม่มีสี รูปพระจันทร์เสี้ยวและไม่มีผนังกัน ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อบนผลพริก ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคแอนแทรกซิสสูงสุด จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ C13 โดยแยกได้จากตัวอย่างผลพริกชี้ฟ้าในอำเภอบางกล่ำ จังหวัดสงขลา



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกซิสที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนผลพริกชี้ฟ้า หลังทำการปลูกเชื้อ 5 วัน

2.4.2 การพิสูจน์โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา

เมื่อนำเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเซอร์คอสปอราซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 12 วัน มาทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้จากข้อ 2.2 บนใบพริกที่ปกติ ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ 3 วัน พบว่าผลมีลักษณะกลมสีน้ำตาลดำ เนื้อเยื่อกลางผลแห้งบาง มีสีขาวหรือสีเทา กลางผลมีราสีเทาค้ำขึ้นเป็นกระจุกและเนื้อเยื่อรอบผลมีสีเหลือง (ภาพที่ 8) และเมื่อทำการแยกเชื้อจากใบพริกดังกล่าวซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี single spore isolation พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อบนใบพริก ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคใบจุดเซอร์คอสปอราสูงสุด จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ Ce9 โดยแยกได้จากตัวอย่างใบพริกชี้ฟ้าในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา



ภาพที่ 8 ลักษณะอาการของโรคใบจุดเซอร์คอสปอราที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนใบพริกชี้ฟ้า หลังทำการปลูกเชื้อ 7 วัน

2.4.3 การพิสูจน์โรครากและโคนเน่า

เมื่อนำเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าของพริกที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน มาทำการปลูกเชื้อบนต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ตรวจสอบอาการโรคหลังทำการปลูกเชื้อ ปลูกเชื้อ 3 วัน พบว่า เปลือกยวบตัวลง มีเส้นใยราสีขาวปกคลุม ในขณะที่วันที่ 10 หลังทำการปลูกเชื้อ พบว่าเชื้อสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมสีน้ำตาลกลม เกาะบริเวณโคนต้นพริก โคนต้นเน่าเปื่อยเป็นสีน้ำตาลดำ ลำต้นปริแตก พริกแสดงอาการใบเหลือง เหี่ยว และยืนต้นตาย (ภาพที่ 9) เมื่อทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งโดยนำเม็ดสเคลอโรเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทำการแยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อราที่นำมาปลูกเชื้อ ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรครากและโคนเน่าสูงสุด จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ S7 โดยแยกได้จากตัวอย่างต้นพริกชี้ฟ้าในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา



ภาพที่ 9 ลักษณะอาการของโรครากและโคนเน่าที่ปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรคบนต้นพริกชี้ฟ้า

(ก) พริกชี้ฟ้าแสดงอาการเหี่ยว ยืนต้นตาย หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

(ข) เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สร้างเม็ดสเคลอโรเทียมเกาะบริเวณโคนต้นพริก

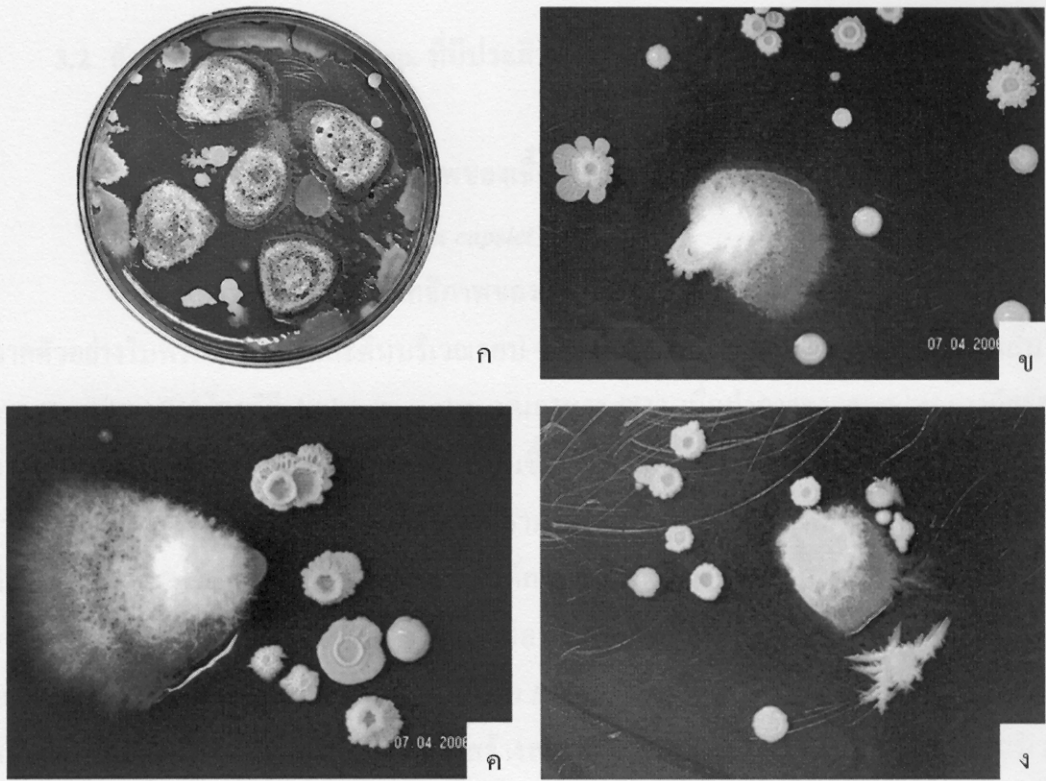
3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

3.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดิน

เมื่อนำตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกจากข้อ 1.2 มาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร PDA และใช้เชื้อรา *C. capsici* C13 เป็นตัวคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเบื้องต้น ทำการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 และการเจริญแบบแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่มาทดสอบปฏิกริยาแกรม และการสร้างเอนโดสปอร์ตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) พบว่าได้เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมด 607 ไอโซเลท (ตารางผนวกที่ 2) โดยแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกมากที่สุด จำนวน 307 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) เนื่องจากดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ดี ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้ส่วนใหญ่มีโคโลนีสีขาว คริม ขอบไม่เรียบ รูปร่างไม่แน่นอน ผิวโคโลนีด้าน (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 2 จำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดิน

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท
ใบพริกปกติ	89
ใบพริกแสดงอาการโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา	35
ผลพริกปกติ	45
ผลพริกแสดงอาการโรคแอนแทรคโนส	131
ดินจากบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริก	307
รวม	607



ภาพที่ 10 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate; (ก) การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และใช้เชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13 เป็นตัวคัดเลือกในเบื้องต้น (ข)-(ง) ปฏิกริยาระหว่างเชื้อ *Bacillus* spp. และเชื้อรา *C. capsici* C13 โดยการเกิดบริเวณยับยั้ง

3.2 คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13

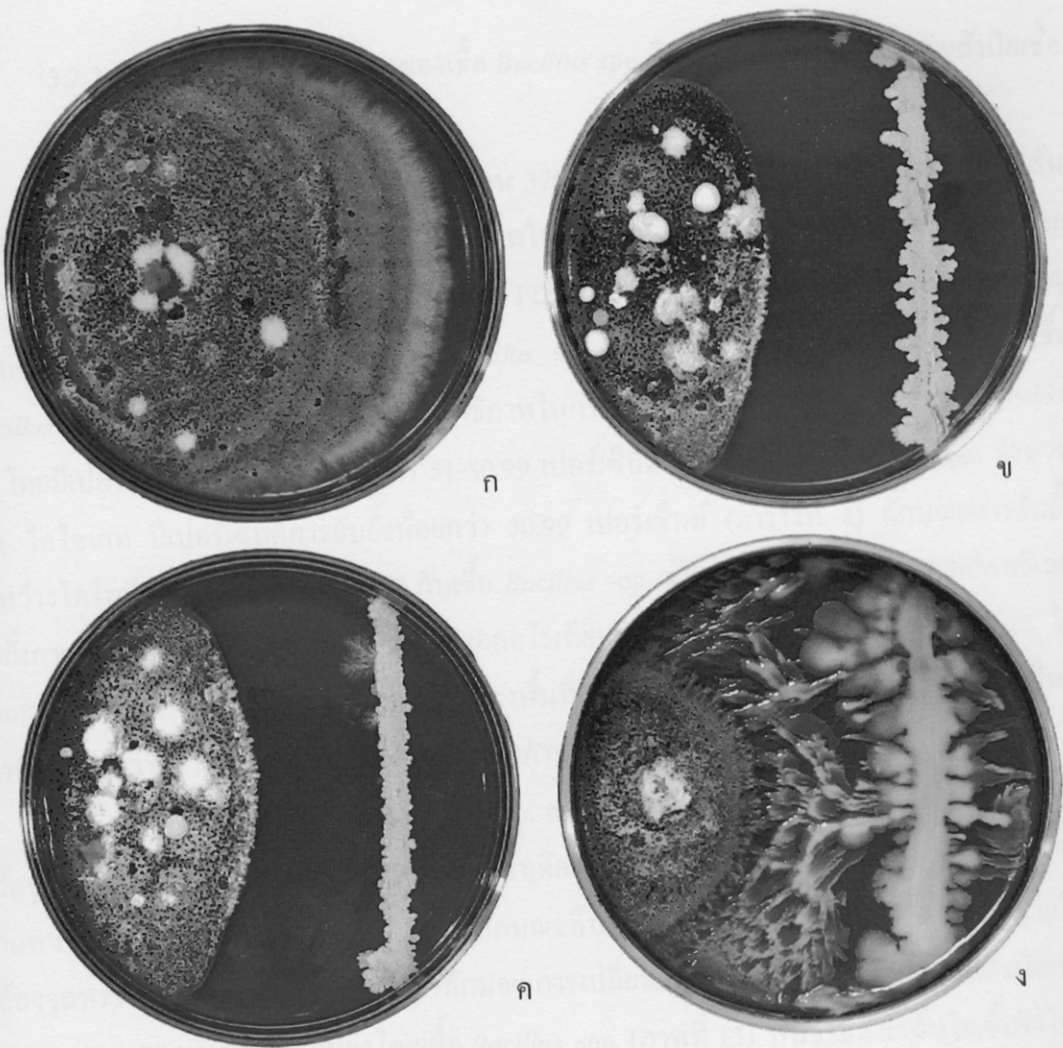
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 607 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพริก ผลพริก และดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA เมื่อทำการตรวจผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ในวันที่ 20 หลังการทดสอบพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 370 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างโคนิเดียมของเชื้อรา *C. capsici* C13 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 71.00-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 237 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ระหว่าง 0.00-70.99 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 เชื้อ *Bacillus* spp. ที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยการสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้ง ทำให้เกิดเป็นบริเวณใส และการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร โดยเกิดจากเชื้อ *Bacillus* spp. บางไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำให้เกิดการแข่งกันการใช้อาหาร ส่งผลให้เชื้อรา *C. capsici* C13 เจริญได้ช้าและหยุดการเจริญ

เมื่อทำการศึกษาดังลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 ที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound พบว่าการแตกแขนงของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 ลดน้อยลง ปลายเส้นใยมีสีน้ำตาลดำ รวมทั้งเส้นใยยังมีลักษณะบวมพอง หยักงอ สิบเล็ก และพบการสร้างโคนิเดียมลดลง

ตารางที่ 3 จำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13 แบบต่าง ๆ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^v	จำนวนไอโซเลท	
	การเกิดบริเวณยับยั้ง	การครอบครองพื้นที่
มากกว่า 91.00	0	3
81.00-90.99	0	13
71.00-80.99	192	162
61.00-70.99	98	48
51.00-60.99	45	16
น้อยกว่า 50.99	18	12
รวม	353	254

^v เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 โดยเชื้อ *Bacillus* spp. คำนวณจาก
$$\left(\frac{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } C. capsici \text{ ในกรรมวิธีควบคุม} - \text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } C. capsici \text{ ในกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{รัศมีโคโลนีเชื้อ } C. capsici \text{ ในกรรมวิธีควบคุม}} \right) \times 100$$



ภาพที่ 11 ปฏิกริยาการยับยั้งของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13 และเชื้อ *Bacillus* spp. หลังการทดสอบ 20 วัน

- (ก) กรรมวิธีควบคุม (ไม่มีเชื้อ *Bacillus* sp.)
- (ข) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7)
- (ค) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3)
- (ง) แบบครอบครองพื้นที่ (เชื้อ *Bacillus* sp. SPT35.1.4)

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

รา *Sclerotium rolfsii* S7

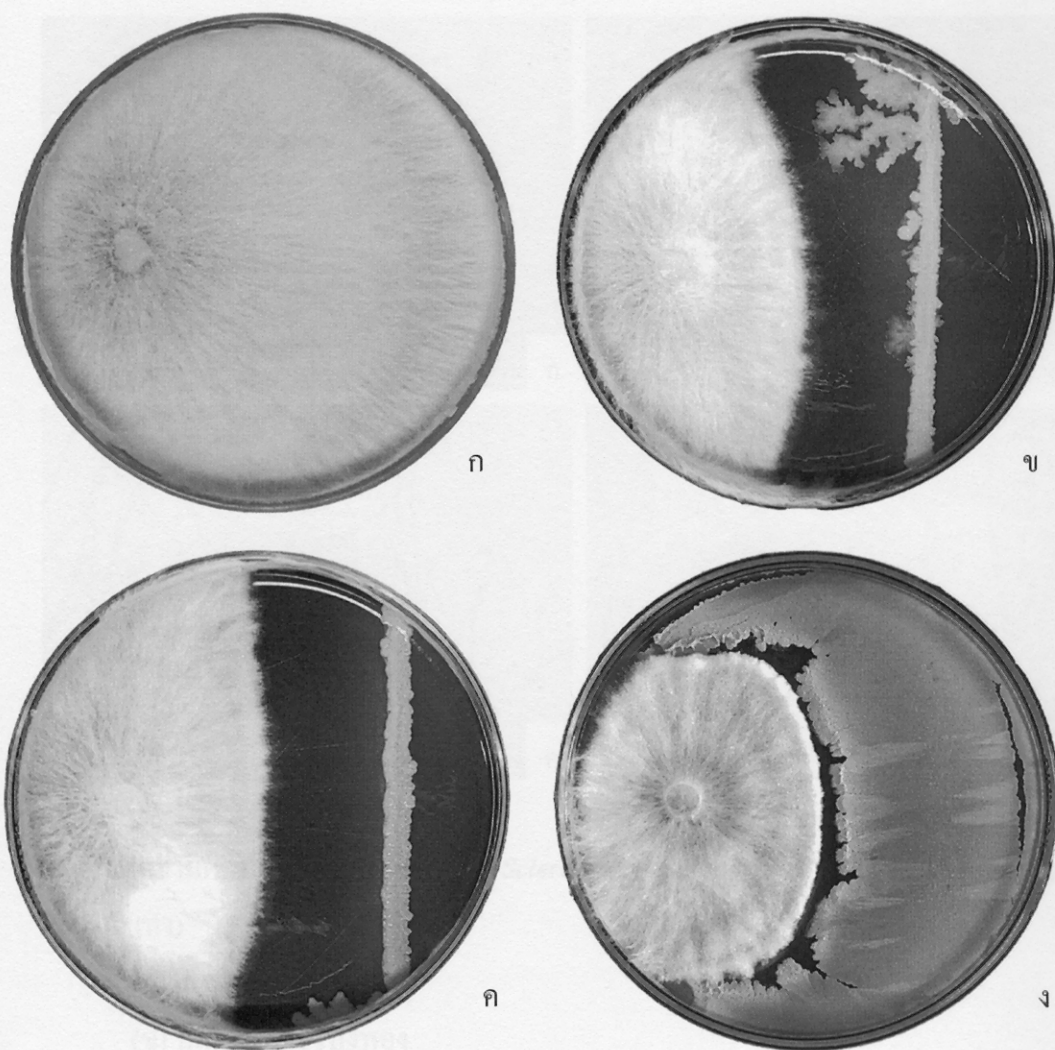
เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 370 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 โดยวิธี dual culture plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อทำการตรวจผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 40 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 51-80.99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 351 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50.99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ลักษณะการยับยั้งระหว่างโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* S7 กับเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นไปในลักษณะของการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อรา *S. rolfsii* S7 จำนวน 28 ไอโซเลท รวมทั้งการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร จำนวน 12 ไอโซเลท (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 51-80.99 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางภาคผนวกที่ 4

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งหรือทำลายชีวิตจุลินทรีย์รอบข้างโดยสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิทำให้เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 ที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. (ภาพที่ 12) มีลักษณะลิบบาง เส้นใยมีสีครีมอ่อน เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 บริเวณที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อ *Bacillus* spp. (ภาพที่ 13) พบว่าปลายเส้นใยเชื้อราไปงอ เกิดการแตกสลาย และการแตกแขนงของเส้นใยลดน้อยลง การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 บริเวณขอบและผ่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเจริญของเส้นใยลดน้อยลง การสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมลดน้อยลง ทั้งยังมีสีน้ำตาลอ่อน รวมตัวเป็นกลุ่มก้อน และอัดตัวกันอย่างหลวม ๆ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ในขณะที่บางไอโซเลทของเชื้อ *Bacillus* spp. มีกลไกการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 โดยการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร บริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* S7 ที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. จะมีลักษณะฟอร์มตัวหนาขึ้น เส้นใยมีสีครีม และไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 บริเวณขอบและผ่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

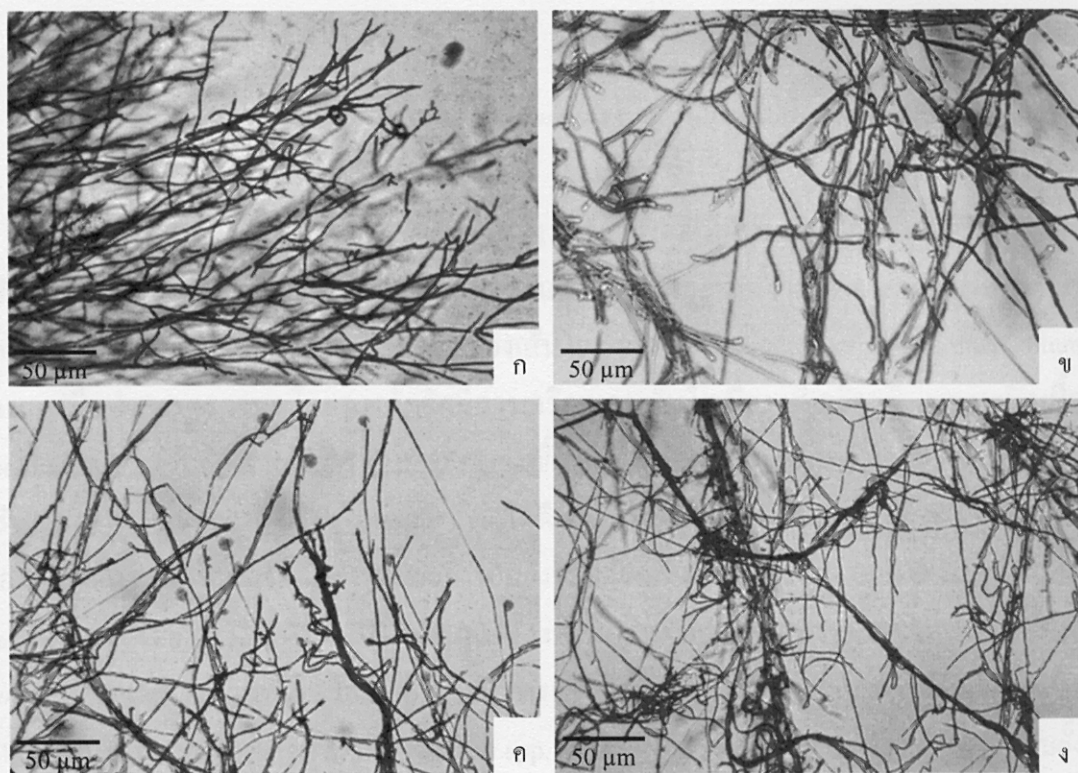
ตารางที่ 4 จำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S7 แบบต่าง ๆ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท	
	การเกิดบริเวณยับยั้ง	การครอบครองพื้นที่
71.00-80.99	0	3
61.00-70.99	5	2
51.00-60.99	23	7
41.00-50.99	49	34
31.00-40.99	20	13
21.00-30.99	21	11
น้อยกว่า 20.99	69	134
รวม	187	204



ภาพที่ 12 ปฏิกริยาการยับยั้งของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S7 และ เชื้อ *Bacillus* spp. หลังการทดสอบ 7 วัน

- (ก) กรรมวิธีควบคุม (ไม่มีเชื้อ *Bacillus* sp.)
- (ข) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SPT32.2.2)
- (ค) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SRN9)
- (ง) แบบครอบครองพื้นที่ (เชื้อ *Bacillus* sp. SPT33.1.2)



ภาพที่ 13 ความผิดปกติของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S7 ที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* spp. (100 เท่า)

- (ก) เส้นใยเจริญปกติ
- (ข) ปลายเส้นใยโป่งพอง
- (ค) ปลายเส้นใยเกิดการแตกสลาย (lysis)
- (ง) การแตกแขนงลดน้อยลง

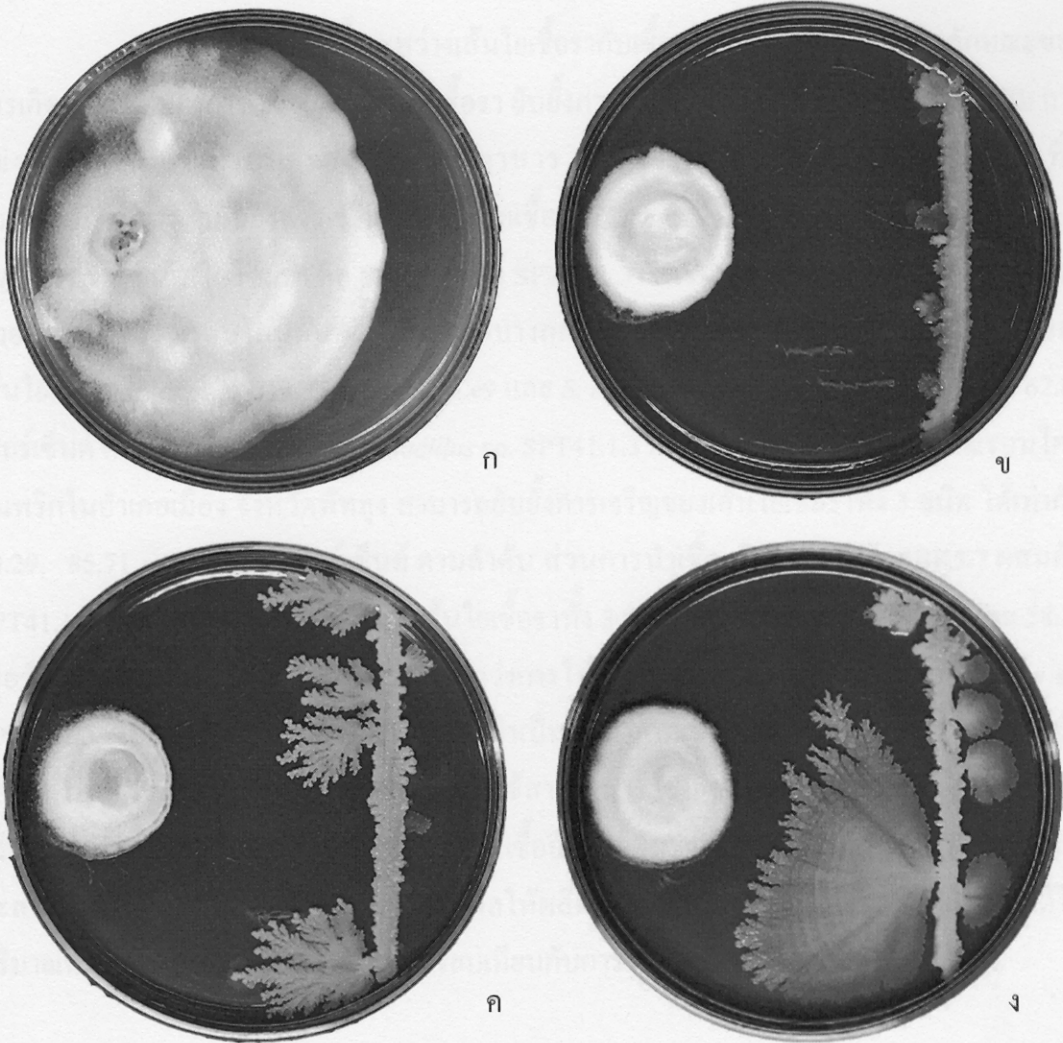
3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ

ร1 *Cercospora capsici* Ce9

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 188 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 21-80.99 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 โดยวิธี dual culture plate เมื่อทำการตรวจผลโดยการวัดปริมาณการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ในวันที่ 45 หลังการทดสอบ พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 ได้ดี ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 71-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 5) ลักษณะการยับยั้งระหว่างเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 และเชื้อ *Bacillus* spp. โดยส่วนใหญ่เป็นไปในลักษณะของการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 จำนวน 118 ไอโซเลท และการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร จำนวน 70 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 188 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยการสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้ง ทำให้เกิดเป็นบริเวณใส และการแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร โดยเกิดจากเชื้อ *Bacillus* spp. บางไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำให้เกิดการแข่งขันการใช้อาหาร ส่งผลให้เชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 เจริญได้ช้าและหยุดการเจริญเติบโต

ตารางที่ 5 จำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9 แบบต่าง ๆ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท	
	การเกิดบริเวณยับยั้ง	การครอบครองพื้นที่
มากกว่า 91.00	0	21
81.00-90.99	93	36
71.00-80.99	25	13
รวม	118	70



ภาพที่ 14 ปฏิกริยาการยับยั้งของเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9 และเชื้อ *Bacillus* spp. หลังการทดสอบ 45 วัน

- (ก) กรรมวิธีควบคุม (ไม่มีเชื้อ *Bacillus* sp.)
- (ข) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7)
- (ค) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3)
- (ง) แบบเกิดบริเวณยับยั้ง (เชื้อ *Bacillus* sp. STB24)

ลักษณะการยับยั้งระหว่างเส้นใยเชื้อรา กับเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นไปในลักษณะของการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ยับยั้งการสร้างโคนิเดียและเม็ดสเคลอโรเทียม การแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่และอาหาร ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13, *Cer. capsici* Ce9 และ *S. rolfii* S7 จำนวน 2 ไอโซเลท คือ SBK5.7 และ SPT41.1.3 ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบโคนต้นพริกในอำเภอบางกล้า จังหวัดสงขลา สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13, *Cer. capsici* Ce9 และ *S. rolfii* S7 ได้เท่ากับ 71.29, 87.00 และ 62.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบโคนต้นพริกในอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้เท่ากับ 69.29, 85.71 และ 58.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการนำเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 ผสมกับ SPT41.1.3 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้เท่ากับ 68.57, 85.00 และ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้เชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 6) เชื่อว่าเป็นผลมาจากเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 หรือ SPT41.1.3 มีความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหาร เช่น ธาตุคาร์บอน เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ได้ดีกว่า ส่งผลให้เชื้ออีกสายพันธุ์เจริญเติบโตได้น้อยลง อีกทั้งเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้รับสารอาหารไม่สมบูรณ์ มีผลให้ผลิตสารออกมายับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในปริมาณน้อยกว่าปกติเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เพียงสายพันธุ์เดียว

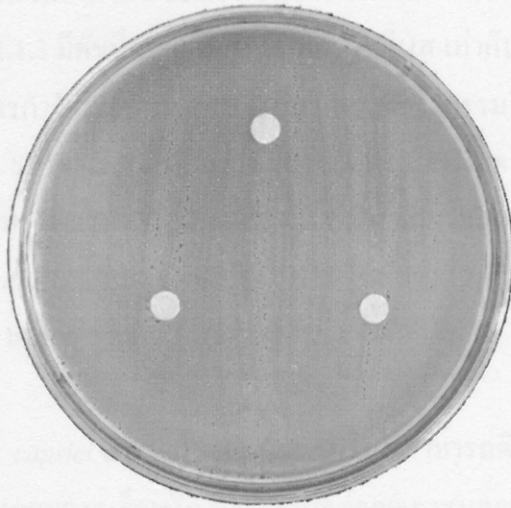
ตารางที่ 6 สรุปผลการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13, *Cercospora capsici* Ce9 และ *Sclerotium rolfii* S7 โดยวิธี dual culture plate

สายพันธุ์เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
	<i>C. capsici</i> C13	<i>Cer. capsici</i> Ce9	<i>S. rolfii</i> S7
SBK5.7	71.29	87.00	62.86
SPT41.1.3	69.29	85.71	58.87
SBK5.7 ผสม SPT41.1.3	68.57	85.00	58.33

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. SBK5.7 และ SPT41.1.3 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการเกิดบริเวณยับยั้ง ซึ่งเป็นลักษณะของกลไกการทำลายชีวิต โดยลักษณะการยับยั้งดังกล่าว อาจเกิดจากการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Bacillus* spp. (Perez *et al*, 1992) ซึ่งการศึกษาของสุชล แก้วพรหม (2539) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pyr. grisea* และ *Rhy. oryzae* โดยการสร้างสารปฏิชีวนะและปล่อยลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ปลายเส้นใยเชื้อรามีลักษณะ โป่งพอง อีกทั้งเส้นใยยังเกิดการบวมที่ ผิดปกติ ผงเซลล์บางลง และบางส่วนยอมไม่ติดสี lactophenol cotton blue รวมทั้งการศึกษาของ Chaurasia และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตสารระเหยที่ส่งผลให้เกิดความ ผิดปกติของเส้นใยและโคนิเดียมของเชื้อรา *A. alternate*, *Cl. oxysporum*, *F. oxysporum* และ *Pa. lilacinus* หรือการยับยั้งเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ อาจเกิดจากกลไกการเป็นปรสิต โดยการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์และปลายเส้นใยเชื้อรา สาเหตุโรค ทั้งยังยับยั้งการสร้างโคนิเดียมและเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อรา *C. capsici* C13 และ *S. rolfisii* S7 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bertagnolli และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าเชื้อ *B. megaterium* B153-2-2 สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนัง เซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา *R. solani* 2B-12

3.3 การทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อ *Bacillus* spp.

เมื่อทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยเกลี่ยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. SBK5.7 ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NGA และหยดแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ลงบน disc พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 ไม่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของโคโลนีสายพันธุ์ SPT41.1.3 (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 สามารถนำมาใช้ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ SPT41.1.3 เพื่อใช้ในทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกซิส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกได้



ภาพที่ 15 ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* spp. SBK5.7 และ SPT41.1.3 ทดสอบวิธี paper disc diffusion บนอาหาร NGA

3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. SBK5.7 และ SPT41.1.3 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกซิส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกตามวิธีการของ Schaad และคณะ (2001) และใช้เครื่อง Biolog Microlog System, Release 4.2 พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp. SBK5.7 จัดอยู่ใน *B. megaterium* De Bary ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดความเสียหายของโรคแอนแทรกโนสในเมล็ดพริกชี้ฟ้า

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการลดการเข้าทำลาย และความคุ้มครองแพร่ระบาดของเชื้อรา *C. capsici* C13 สาเหตุโรคแอนแทรกโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าด้วยวิธี standard blotter plate โดยปลูกเชื้อบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. capsici* C13 ก่อนแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคในวันที่ 9 หลังปลูกเชื้อรา *C. capsici* C13 พบว่าในกรรมวิธีควบคุมมีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรกโนสเท่ากับ 62.24 ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรกโนส เท่ากับ 36.16 ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม และสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว ที่มีดัชนีการเกิดโรคแอนแทรกโนสเท่ากับ 54.40 และ 48.32 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) สอดคล้องกับการทดลองของ Jiang และคณะ (2006) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อ *B. subtilis* BF (BB11 ผสมกับ FH17 ในอัตราส่วน 1:1) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค *Phytophthora* blight ของพริกหวาน สูงกว่าการใช้เชื้อ *B. subtilis* BB11 และ FH17 เพียงอย่างเดียว

เชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พริก ทำให้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริก ทั้งยังส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต ดังนั้นการแช่เมล็ดพันธุ์พริกก่อนปลูกด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 จะช่วยลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค เท่ากับ 41.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม และในทุกกรรมที่แช่เมล็ดพันธุ์พริกด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ดีกว่าในกรรมวิธีควบคุม โดยเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อาศัยอยู่บนเปลือกหุ้มเมล็ด อาจผลิตสารยับยั้ง หรือเจริญแข่งขันเพื่อครอบครองพื้นที่ และอาหาร ทำให้ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* C13 ที่อยู่บนบริเวณเปลือก จึงช่วยลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริกได้

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเข้าทำลายเมล็ดพริกชี้ฟ้าโดยเชื้อ *Colletotrichum capsici* C13 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

กรรมวิธี ^{1/}	ระดับการเกิด	ดัชนีการเกิด	เปอร์เซ็นต์ลดการเกิด
	โรค ^{2/}	โรค ^{3/}	โรค ^{4/}
กรรมวิธีควบคุม	3.11 e ^{5/}	62.24 e	0.00
<i>B. megaterium</i> SBK5.7	2.72 d	54.40 d	12.60
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3	2.42 c	48.32 c	22.37
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+SPT41.1.3	1.81 b	36.16 b	41.90
คาร์เบนดาซิม	1.00 a	20.00 a	67.87

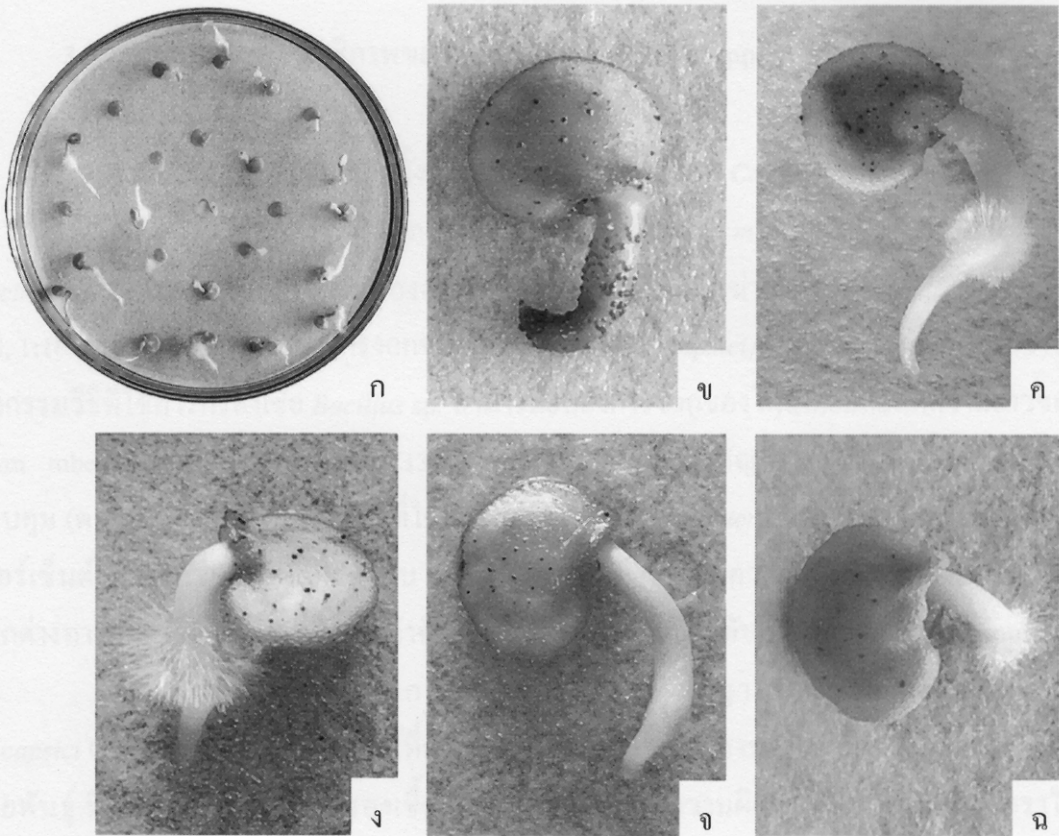
^{1/}ปลูกเชื้อรา *C. capsici* C13 บนเมล็ดพริกชี้ฟ้า 2 วัน ก่อนแช่ด้วยเชื้อ *Bacillus* spp. คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคในวันที่ 9 หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค

^{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)

$$\text{ดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนส} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดพริกชี้ฟ้า} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

^{3/}ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกซ์ของเมล็ดพริก
ชี้ฟ้า หลังทดสอบ 11 วัน

(ก) ทดสอบด้วยวิธี standard blotter plate

(ข) กรรมวิธีควบคุม

(ค) เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7

(ง) เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(จ) เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสม *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(ฉ) สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา

3.6.1 การทดสอบการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่อัตราส่วนของสารกรองเชื้อต่อน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 บนสไลด์หลุม พบว่าในทุกกรรมวิธีที่ใช้สารกรองเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียมและลดความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *C. capsici* C13 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับควบคุม (ตารางที่ 8) โดยในกรรมวิธีที่ใช้สารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ที่ไม่เจือจาง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียมเท่ากับ 6.11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm

เมื่อตรวจดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อัตราส่วนของสารกรองเชื้อเท่ากัน จะส่งผลต่อความผิดปกติของโคนิเดียมเชื้อราในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เช่น โคนิเดียมมีลักษณะบวมโต appressorium มีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดการยืดยาว และมีลักษณะโค้งงอ (ภาพที่ 17) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมและลดความยาวของ germ tube ของเชื้อราขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีอยู่ในสารกรอง

นอกจากนี้ Okigbo (2005) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *B. subtilis* ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าของพืชหัวในสกุล *Dioscorea* spp. หลังเก็บเกี่ยว พบว่าประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *B. subtilis* B1 ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Aspergillus niger* van Tiegh *F. solani* (Mart.) Sacc. และ *Penicillium oxalicum* Currie and Thom ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารกรองเชื้อ และจากการศึกษาของ Landa และคณะ (1997) พบว่าสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. RGAF6a, RGAF6b, RGAF12 และ RGAF51 สามารถยับยั้งการงอกของไมโครโคนิเดียมและเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo and K. Sato สาเหตุโรคเหี่ยวของถั่วชิกพี ในขณะที่การศึกษาของ Mahadtanapuk และคณะ ในปี 2007 พบว่าการใช้แบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 2×10^8 , 3×10^8 และ 4×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกและทำให้เกิดความผิดปกติของโคนิเดียมเชื้อรา *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของกล้วย

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13

กรรมวิธี ^{1/} (อัตราส่วนของสารกรองเชื้อ:น้ำกลั่น)	<i>Colletotrichum capsici</i> C13		
	เปอร์เซ็นต์การงอก ^{2/}	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอก ^{3/}	ความยาว germ tube (μm) ^{4/}
กรรมวิธีควบคุม	86.11 m ^{5/}	0.00	193.33 k
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:0)	6.11 a	92.91	10.00 a
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:1)	17.77 d	79.36	20.00 c
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:2)	21.66 e	74.85	26.67 cd
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:4)	23.33 f	72.91	33.33 de
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:8)	25.00 g	70.97	63.33 g
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:16)	28.33 i	67.10	80.00 h
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:32)	30.00 j	65.16	93.33 i
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:0)	7.77 b	90.97	10.00 a
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:1)	22.77 f	73.55	30.00 d
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:2)	25.00 g	70.97	50.00 f
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:4)	27.77 i	67.75	51.67 f
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:8)	28.33 i	67.10	66.67 g
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:16)	30.55 j	64.52	83.33 h
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:32)	32.77 k	61.94	96.67 i
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:0)	10.00 c	88.39	10.00 a
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:1)	23.33 f	72.91	33.33 de
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:2)	26.66 h	69.04	40.00 e
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:4)	28.33 i	67.10	53.33 f
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:8)	32.77 k	61.94	80.00 h
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:16)	33.33 k	61.29	96.67 i
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:32)	35.00 l	59.35	116.67 j
คาร์เบนดาซิม (ความเข้มข้น 1,600 ppm)	5.55 a	93.55	15.00 ab

ตารางที่ 8 (ต่อ)

¹ หยดสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 คาร์เบนคาซิม และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนสไลด์หลุม และหยดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. capsici* C13

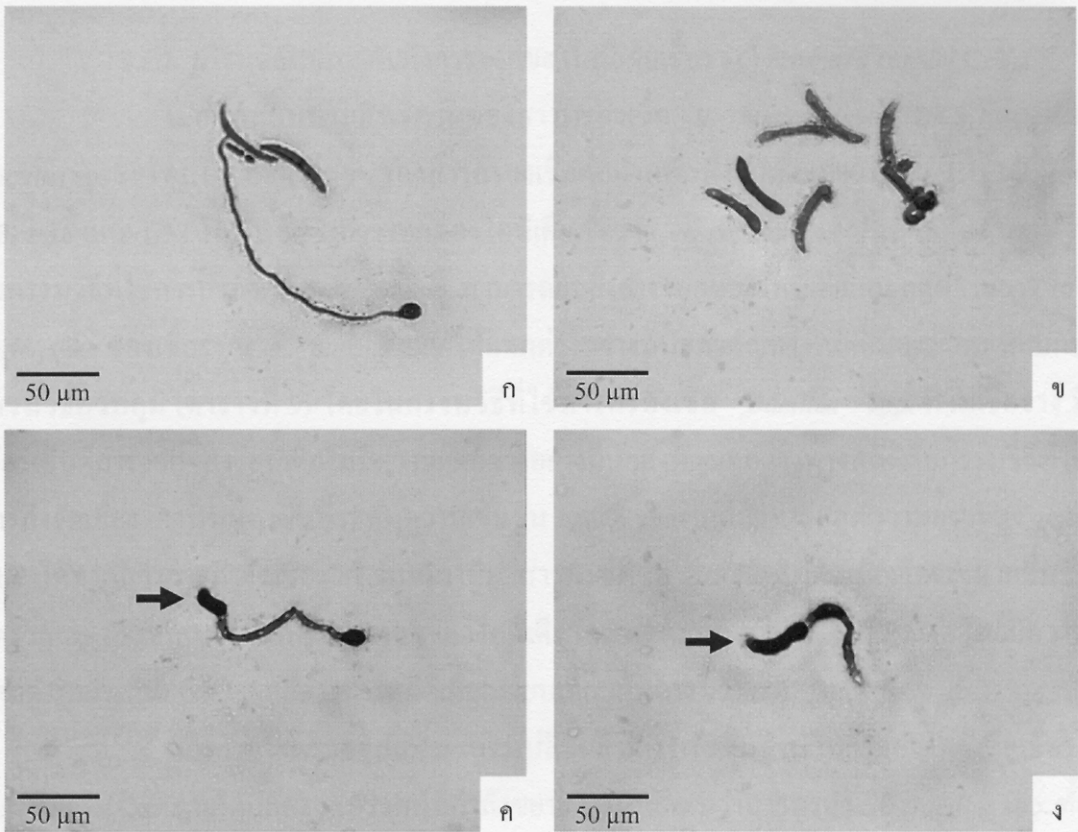
² เปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 หลังทดสอบ 24 ชั่วโมง

³ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 หลังทดสอบ 24 ชั่วโมง คำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของโคนิเดียม} = 100 - \left[\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การงอกในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์การงอกในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

⁴ ความยาว germ tube ของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13

⁵ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 17 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 ในการยับยั้งการงอกของ
โคนิเดียมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13 (100 เท่า)

- (ก) กรรมวิธีควบคุม (โคนิเดียมปกติ)
- (ข) โคนิเดียมไม่งอก และมีลักษณะบวมโต
- (ค) appressorium มีขนาดใหญ่ขึ้น
- (ง) appressorium ยึดยาว และมีลักษณะโค้งงอ

3.6.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่อัตราส่วนของสารกรองเชื้อต่อน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อเท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 บนสไลด์หลุม พบว่า ในกรรมวิธีที่ใช้สารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียมและลดความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 9) โดยในกรรมวิธีที่ใช้สารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ไม่เจือจาง มีเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm แต่สามารถลดความยาวของ germ tube ได้มากกว่าสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม สารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. เมื่อเจือจางมากขึ้นถึง อัตราส่วน 1:32 ก็สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียม และลดความยาวของ germ tube โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

เมื่อทำการตรวจดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของโคนิเดียมเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่อัตราส่วนของสารกรองเชื้อเท่ากัน จะส่งผลต่อความผิดปกติของโคนิเดียมเชื้อราใน ลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เช่น โคนิเดียมมีลักษณะบวมโต และความยาว germ tube ลดลง (ภาพที่ 18) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียม และลดความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของสาร เมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีอยู่ในสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp.

โคนิเดียมเป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคกับพืช โดยทั่วไปแล้วโคนิเดียมจะ ปลิวไปตกบนใบพืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม โคนิเดียมจะเริ่มงอกโดยการสร้าง germ tube และ appressorium เพื่อใช้ในการแทงผ่านเข้าสู่เซลล์พืช เมื่อสารใดสามารถยับยั้งการงอกหรือทำให้เกิด ความผิดปกติต่อโคนิเดียมเชื้อสาเหตุโรคได้ ทำให้มีศักยภาพที่จะลดการเกิดโรคของพืชได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 สามารถยับยั้ง การงอกและลดความยาว germ tube ของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 และ *Cer. capsici* Ce9 แสดง ว่าสารกรองเชื้อดังกล่าว สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสและโรค ใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกได้เช่นกัน ซึ่งเชื่อว่าอาจเกิดจากในสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. มีสาร ปฏิชีวณะ เช่น iturin, surfactin และ fengycin (Katz and Demain, 1977) หรือเอนไซม์ที่สามารถย่อย สลายผนังเซลล์เชื้อรา (Leelasuphakul *et al.*, 2006) จึงทำให้โคนิเดียมเกิดความผิดปกติต่าง ๆ เช่น มี ลักษณะบวมโต ความยาวของ germ tube ลดลง รวมทั้ง appressorium มีขนาดใหญ่ขึ้นและโค้งงอ

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกของโคนิเดียมเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9

กรรมวิธี ^{1/} (อัตราส่วนของสารกรองเชื้อ:น้ำกลั่น)	<i>Cercospora capsici</i> Ce9		
	เปอร์เซ็นต์การงอก ^{2/}	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอก ^{3/}	ความยาว germ tube (μm) ^{4/}
กรรมวิธีควบคุม	98.33 r ^{5/}	0.00	570.00 o ^{6/}
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:0)	5.00 a	94.92	16.67 a
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:1)	7.77 b	92.09	50.00 b
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:2)	16.66 e	83.06	88.33 d
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:4)	27.77 h	71.75	136.67 e
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:8)	41.66 k	57.63	196.67 g
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:16)	70.55 n	28.25	263.33 i
<i>B. megaterium</i> SBK5.7 (1:32)	95.55 p	2.82	353.33 j
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:0)	5.55 a	94.35	16.67 a
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:1)	8.89 c	90.96	56.67 bc
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:2)	18.00 f	81.69	90.00 d
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:4)	31.66 i	67.80	146.67 ef
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:8)	48.66 l	50.51	206.67 g
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:16)	73.33 o	25.42	400.00 k
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3 (1:32)	96.66 q	1.70	500.00 m
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:0)	5.55 a	94.35	18.33 a
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:1)	10.00 d	89.83	63.33 c
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:2)	20.55 g	79.10	93.33 d
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:4)	38.33 j	61.02	156.67 f
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:8)	50.00 m	49.15	220.00 h
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:16)	73.89 o	24.86	416.67 l
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+ SPT41.1.3 (1:32)	98.33 r	0.00	513.33 n
คาร์เบนดาซิม (ความเข้มข้น 1,600 ppm)	6.11 a	93.79	53.33 bc

ตารางที่ 9 (ต่อ)

¹ หยดสารกรองเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บนสไลด์หลุม และหยดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9

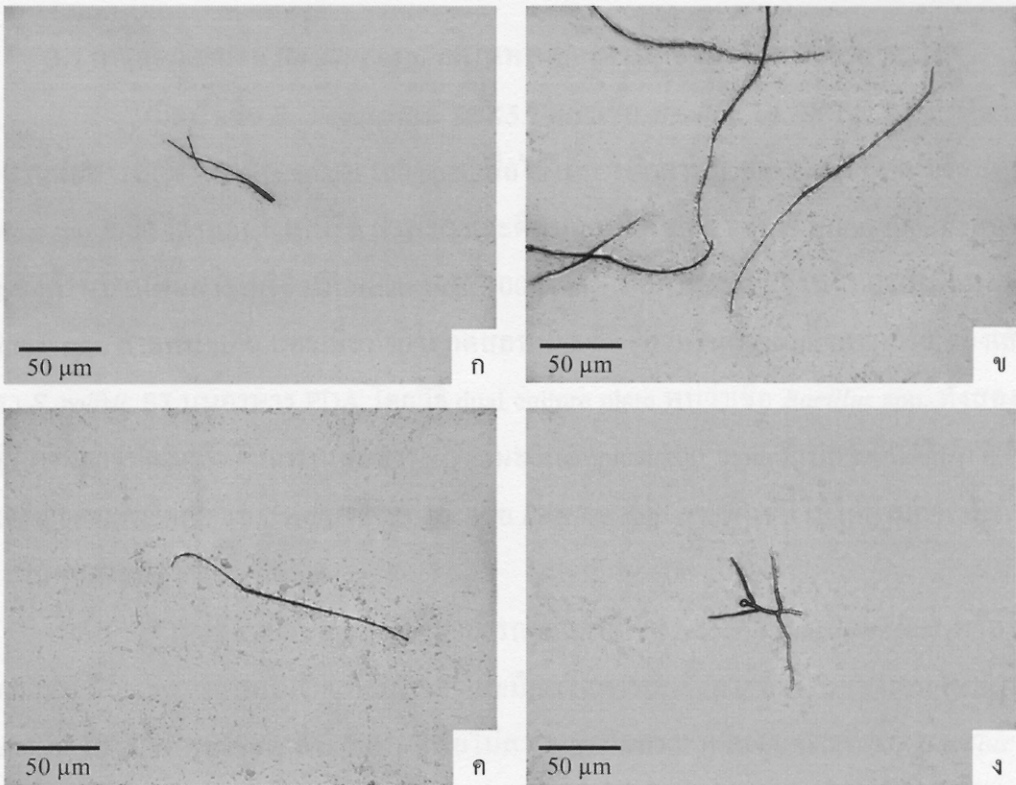
² เปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 หลังทดสอบ 24 ชั่วโมง

³ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9 หลังทดสอบ 24 ชั่วโมง คำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของโคนิเดีย} = 100 - \left[\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การงอกในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์การงอกในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

⁴ ความยาว germ tube ของโคนิเดียเชื้อรา *Cer. capsici* Ce9

⁵ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 ในการยับยั้งการงอกของ
โคนิเดียเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9 (100 เท่า)

(ก) กรรมวิธีควบคุม (โคนิเดียปกติ)

(ข) กรรมวิธีควบคุม (โคนิเดียงอกปกติ)

(ค) โคนิเดียงอก แต่ germ tube สั้น

(ง) germ tube สั้น และมีขนาดใหญ่ขึ้น

3.7 การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin

เมื่อนำเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm เพื่อใช้ในการติดตามประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริก ผลพริก และดินปลูกพริก พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์เดิม และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* S7 บนอาหาร PDA โดยวิธี dual culture plate พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfii* S7 เท่ากับเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin

สารปฏิชีวนะ rifampicin สามารถผลิตจากเชื้อ *Nocardia mediterranei* หรือวิธีกึ่งสังเคราะห์ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ RNA การที่เชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งเคยไวต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin แล้วสามารถพัฒนาให้เกิดการต้านทานได้ เนื่องจากยีน *rpoB* ที่อยู่บนโครโมโซมเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้ rifampicin ไม่สามารถเข้าจับกับ β -subunit ของ RNA polymerase เพื่อการออกฤทธิ์ได้ต่อไป (มาลิน จุลศิริ, 2536)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุด เซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า ในสภาพแปลงทดลอง

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกชี้ฟ้า

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. megaterium* SBK5.7 *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin คาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่น ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรคด้วยวิธี descriptive area กับผลพริกชี้ฟ้าทั้งต้น พบว่าการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย และคาร์เบนดาซิม สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสในสภาพแปลงทดลองได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น โดยในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 มีดัชนีการเกิดโรคแอน

แตรคโนสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm (ตารางที่ 10) ดังนั้นเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 จึงมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (ภาพที่ 19) ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียแวนลอย *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสในสภาพแปลงทดลองน้อยกว่าการใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับการทดลองของ Mahadtanapuk และคณะ (2007) พบว่าการใช้แบคทีเรียแวนลอย *B. licheniformis* ผสมกับ *B. amyloliquefaciens* หรือ *B. subtilis* สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของกล้วยได้น้อยกว่าการใช้เชื้อ *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* หรือ *B. subtilis* เพียงอย่างเดียว

อย่างไรก็ตาม เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกที่พบในประเทศไทยมีด้วยกันหลายชนิด เช่น *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. coccodes* และ *C. gloeosporioides* รวมทั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงปลูก เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคตามธรรมชาติ ดังนั้นอาการโรคแอนแทรคโนสที่ปรากฏดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรามากกว่า 1 ชนิด

ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแวนลอยและคาร์เบนดาซิม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น โดยในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 มีปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (ตารางที่ 10)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า จากผลการทดลองพบว่าการฉีดพ่นต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแวนลอย และคาร์เบนดาซิม สามารถลดการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราในสภาพแปลงทดลองได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 10) โดยในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	ดัชนีการเกิดโรค ^{2/}		เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค ^{3/}		ผลผลิต (กิโลกรัมต่อไร่)
	แอนแทรกโนส	ใบจุดเซอร์คอสปอรา	แอนแทรกโนส	ใบจุดเซอร์คอสปอรา	
น้ำกลั่น	87.50 c ^{4/}	65.00 c	0.00	0.00	304.91 d
<i>B. megaterium</i> SBK5.7	56.25 ab	40.00 ab	35.71	38.46	415.97 a
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3	58.75 b	38.75 ab	32.86	40.38	390.71 b
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7 ผสม SPT41.1.3	61.25 b	42.50 b	30.00	34.62	380.26 c
คาร์เบนดาซิม	50.00 a	36.25 a	42.86	44.23	418.90 a

^{1/} ดินพ่นด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus* spp. และคาร์เบนดาซิม ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน

$$^2/ \text{ ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนใบหรือผลพริก} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$^3/ \text{ เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

^{4/} ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี

Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 19 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนส ของพริกชี้ฟ้า อายุ 4 เดือน

- (ก) อาการ โรคแอนแทรกโนสของพริกชี้ฟ้า
- (ข) กรรมวิธีควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น)
- (ค) ฉีดพ่นเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7
- (ง) ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3
- (จ) ฉีดพ่นเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสม *Bacillus* sp. SPT41.1.3
- (ฉ) ฉีดพ่นคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm



ภาพที่ 20 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริก
ซีฟ้าอายุ 4 เดือน

(ก) อาการ โรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกซีฟ้า

(ข) กรรมวิธีควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น)

(ค) ฉีดพ่นเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7

(ง) ฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(จ) ฉีดพ่นเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสม *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(ฉ) ฉีดพ่นคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน เมื่อราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า อายุ 2 เดือน ด้วยแบคทีเรียแขวนลอย คาร์บอกซิน ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน และปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* S7 อัตราส่วน 15 กรัมต่อต้น เมื่อทำการประเมินระดับความรุนแรงของโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าโดยนับจำนวนต้นที่รอดตายและเมล็ดเคลอโรเทียม และทดสอบการมีชีวิตของเมล็ดเคลอโรเทียมบนอาหาร PDA พบว่าในกรรมวิธีที่ราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *B. megaterium* SBK5.7, *Bacillus* sp. SPT41.1.3, *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 และคาร์บอกซิน สามารถลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11) และทุกกรรมวิธีลดการเกิดโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น (ภาพที่ 21)

ปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น และกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน (ตารางที่ 11) เนื่องจากในกรรมวิธีที่ราดดินด้วยคาร์บอกซิน ทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน ต้นพริกชี้ฟ้าแสดงอาการ phytotoxic เช่น ขอบใบมีสีเหลือง ปลายใบไหม้ และดินแคะแกระ็น

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการควบคุมโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี ^{1/}	ดัชนีการเกิดโรค ^{2/}	เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค ^{3/}	ผลผลิต (กิโลกรัมต่อไร่)
น้ำกลั่น	61.25 b ^{4/}	0.00	303.89 c
<i>B. megaterium</i> SBK5.7	43.75 a	28.57	374.78 a
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3	42.50 a	30.61	384.55 a
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+SPT41.1.3	45.00 a	26.53	343.73 b
คาร์บอกซิน	40.00 a	34.69	260.29 d

^{1/} ราคินด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus* spp. และคาร์บอกซิน ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน และปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* S7

^{2/} ดัชนีการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

^{3/} เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

^{4/} ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 21 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า อายุ 4 เดือน

(ก) ต้นพริกชี้ฟ้าปกติ

(ข) กรรมวิธีควบคุม (ราดดินด้วยน้ำกลั่น)

(ค) ราดดินด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7

(ง) ราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(จ) ราดดินด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสม *Bacillus* sp. SPT41.1.3

(ฉ) ราดดินด้วยคาร์บอซิม ที่ระดับความเข้มข้น 375 ppm

เมื่อนับจำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมที่เชื้อรา *S. rolfii* S7 สร้างขึ้นบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า พบว่าในกรรมวิธีที่ราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. มีจำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ราดดินด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 12) โดยในกรรมวิธีที่ราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดดินด้วยสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน และเมื่อทำการทดสอบการมีชีวิตของเม็ดสเคลอโรเทียมดังกล่าวบนอาหาร PDA พบว่าทุกกรรมวิธี มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเม็ดสเคลอโรเทียมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของพริกโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. เพื่อให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีองค์ประกอบหลายประการ เช่น เชื้อ *Bacillus* spp. ต้องมีความสามารถในการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิและเอนไซม์ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพริก สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีความสามารถในการครอบครองพื้นที่และอาหาร บริเวณรอบ ๆ รากพืชได้ดี รวมทั้งการจัดการสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. และการปรับให้เป็นสภาพให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคของพริก (Weller and Cook, 1983)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถนำเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกมาใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของพริก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในการยับยั้งการสร้างและการงอกของ เม็ดสเคลอโรเทียม

กรรมวิธี ^{1/}	จำนวนเม็ดสเคลอโรเทียม ^{2/} (เม็ดต่อต้น)	เปอร์เซ็นต์การงอก ^{3/}
น้ำกลั่น	269.25 d ^{4/}	100.00
<i>B. megaterium</i> SBK5.7	85.25 b	100.00
<i>Bacillus</i> sp. SPT41.1.3	72.00 a	100.00
<i>Bacillus</i> spp. SBK5.7+SPT41.1.3	108.25 c	100.00
คาร์บอกซิน	66.50 a	100.00

^{1/} ราคินด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus* spp. และคาร์บอกซิน ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน และปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* S7

^{2/} จำนวนเม็ดสเคลอโรเทียมบริเวณ โคนต้นพริกชี้ฟ้าหลังราคินด้วยน้ำกลั่น เชื้อ *Bacillus* spp. และคาร์บอกซิน

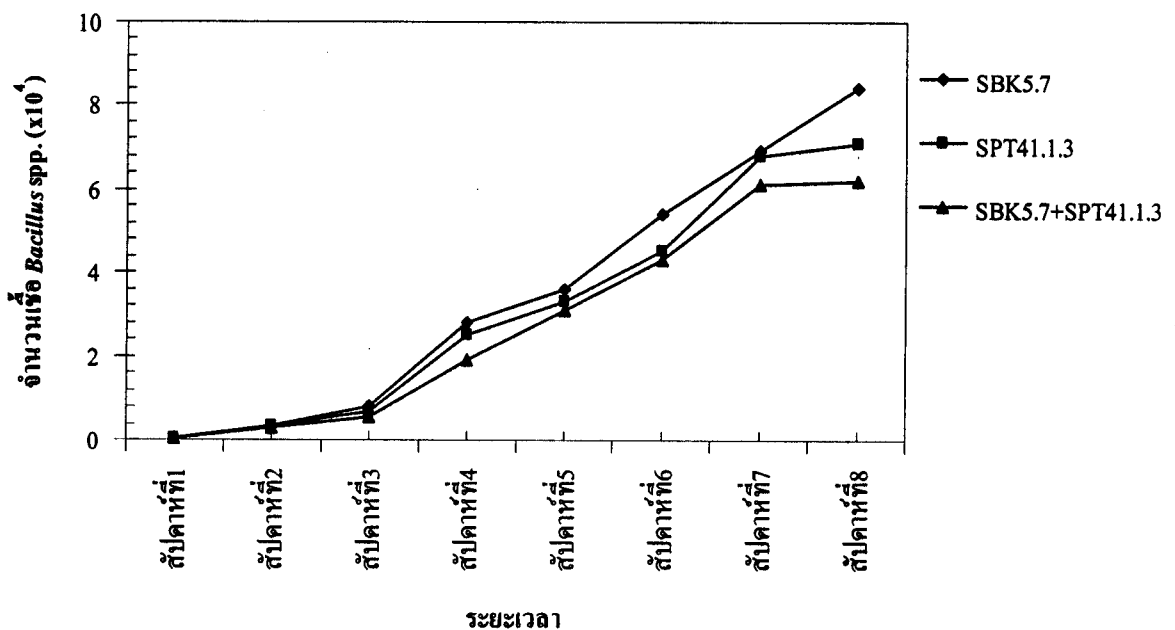
^{3/} เปอร์เซ็นต์การงอกของเม็ดสเคลอโรเทียมบนอาหาร PDA

^{4/} ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

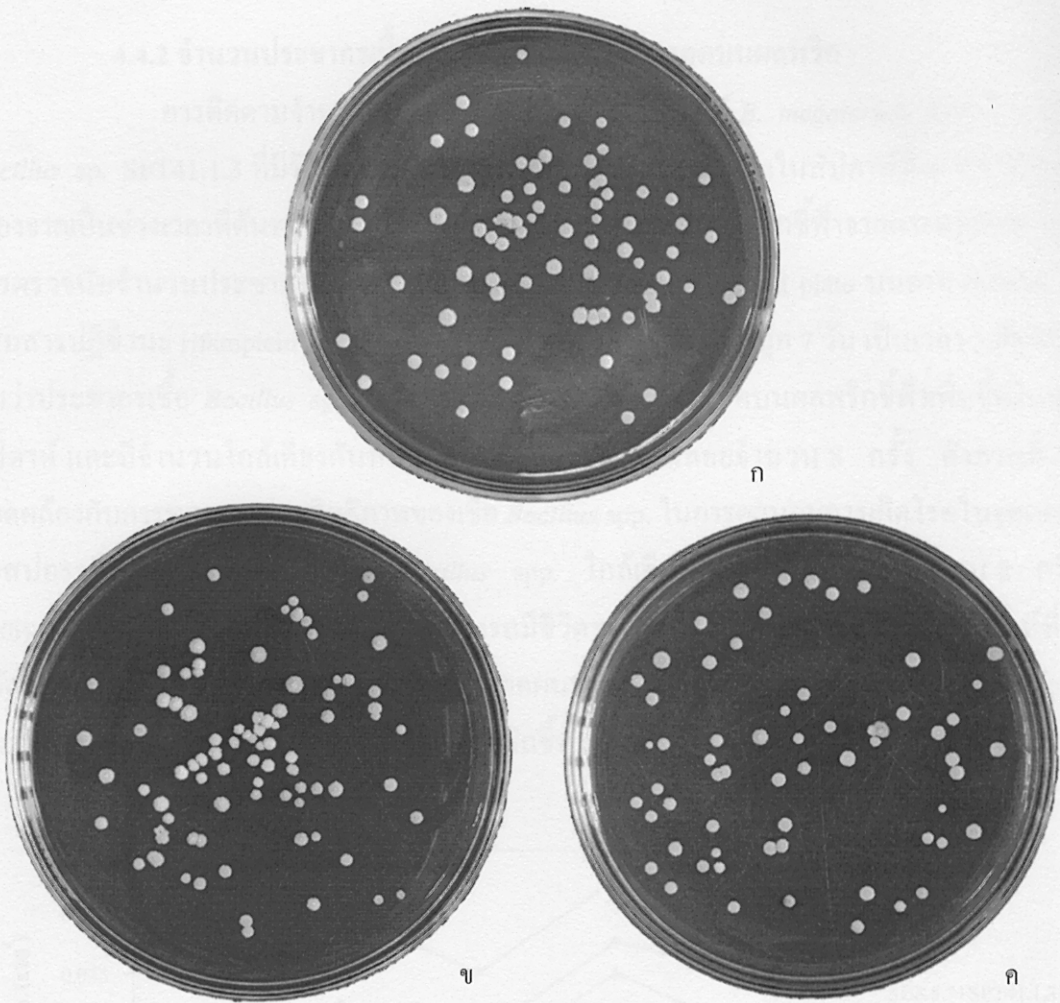
4.4 การติดตามประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริก ผลพริก และดิน

4.4.1 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริกพริกชี้ฟ้า

เมื่อทำการติดตามประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตรอดหลังการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน โดยนำตัวอย่างใบพริกจากการทดลองมาตรวจนับจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm พบว่าจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ในทุกกรรมวิธีมีจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ใกล้เคียงกันหลังฉีดพ่นแบคทีเรียแขวนลอยจำนวน 8 ครั้ง ดังภาพที่ 22 และ 23 เมื่อนับจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบพริกชี้ฟ้า พบว่าการฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* spp. ในครั้งที่ 8 ประชากรเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 สามารถมีชีวิตอยู่บนใบพริกชี้ฟ้าสูงสุด เท่ากับ 8.50×10^4 cfu/ml (ตารางภาคผนวกที่ 6)



ภาพที่ 22 จำนวนประชากรของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนใบพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน



ภาพที่ 23 จำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนไบโอฟิล์มที่ฟุ้งา ตรวจนับด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm

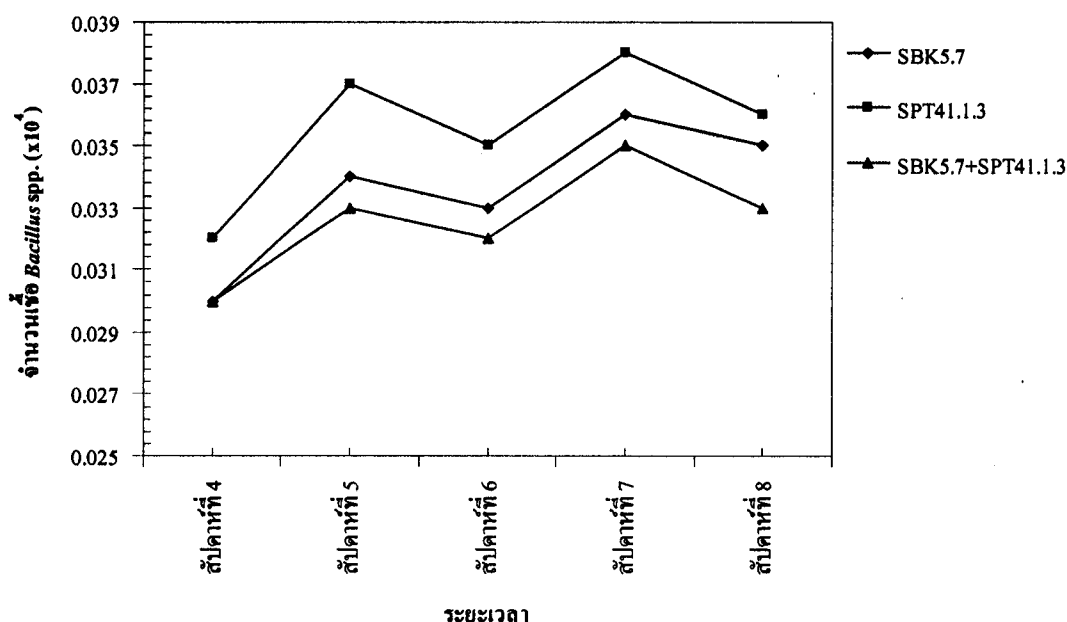
(ก) เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 (8.40×10^4 cfu/ml)

(ข) เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 (7.10×10^4 cfu/ml)

(ค) เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสม *Bacillus* sp. SPT41.1.3 (6.20×10^4 cfu/ml)

4.4.2 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนผลพริก

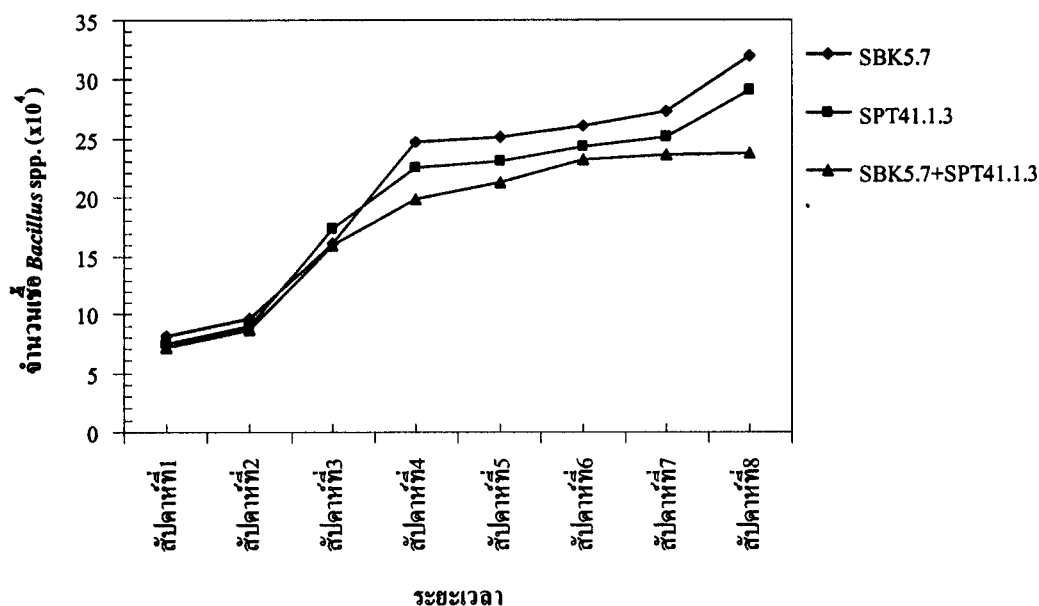
การติดตามจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตรอดบนผลพริกชี้ฟ้า เริ่มทำการติดตามในสัปดาห์ที่ 4 หลังฉีดพ่น เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ต้นพริกชี้ฟ้าเริ่มให้ผลผลิต โดยนำตัวอย่างผลพริกชี้ฟ้าจากการทดลองมาทำการตรวจนับจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ตรวจนับทุก 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ในทุกกรรมวิธีสามารถมีชีวิตรอดบนผลพริกชี้ฟ้าเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ และมีจำนวนใกล้เคียงกันหลังฉีดพ่นแบคทีเรียแขวนลอยจำนวน 8 ครั้ง ดังภาพที่ 24 สอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดเชอร์คอสปอราที่มีจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ใกล้เคียงกันหลังฉีดพ่นเชื้อจำนวน 8 ครั้ง โดยเฉพาะเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนผลพริกชี้ฟ้าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 หลังฉีดพ่น เท่ากับ 0.036×10^4 cfu/ml (ตารางภาคผนวกที่ 7) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถเจริญอยู่บนผิวผลได้น้อยกว่าบนผิวใบพริกชี้ฟ้า



ภาพที่ 24 จำนวนประชากรของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนผลพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

4.4.3 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดในดินรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า

เมื่อทำการติดตามประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตรอดหลังการราดดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าด้วยแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน โดยนำตัวอย่างดินจากการทดลองมาตรวจนับจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm พบว่าจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ในทุกกรรมวิธีมีจำนวนใกล้เคียงกันหลังฉีดพ่นแบคทีเรียแขวนลอยจำนวน 8 ครั้ง ดังภาพที่ 25 และเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 สามารถมีชีวิตอยู่ในดินรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้าสูงสุด เท่ากับ 3.20×10^5 cfu/ml (ตารางภาคผนวกที่ 8) สอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดเชอร์รี่คอสปอราของพริก เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการปรับตัวให้มีชีวิตรอดในสภาพแปลงปลูก พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถปรับตัวให้มีชีวิตอยู่รอดในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้าได้ดีกว่าการอาศัยอยู่บนใบพริก หรือผลพริกชี้ฟ้า เนื่องจากในดินมีแหล่งอาหาร และเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต



ภาพที่ 25 จำนวนประชากรของเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเซอร์โคสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริก โดยทำการแยกเชื้อรา *C. capsici* C13, *Cer. capsici* Ce9 และ *S. rolfsii* S7 และเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างใบพริก ผลพริกและดินในพื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส พัทลุง และสงขลา เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 607 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13, *Cer. capsici* Ce9 และ *S. rolfsii* S7 ระหว่าง 71-100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 370 188 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ

คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริก จำนวน 2 สายพันธุ์คือ เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* C13, *Cer. capsici* Ce9 และ *S. rolfsii* S7 เท่ากับ 71.29, 87.00 และ 62.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้เท่ากับ 69.29, 85.71 และ 58.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลักษณะการยับยั้งระหว่างเส้นใยเชื้อรากับเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นไปในลักษณะของการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใย สร้างโคนิเดีย และเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* SBK5.7 ไม่แสดงปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ดังนั้นเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์จึงมีความสามารถในการเจริญร่วมกันได้

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* C13 สาเหตุโรคแอนแทรกโนสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าด้วยวิธี standard blotter plate พบว่าการใช้แบคทีเรียแวนลอย *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ 41.90

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว

สารกรองเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่ไม่เจือจาง สามารถยับยั้งการงอกและลดความยาวของ germ tube ของโคนิเดียมเชื้อรา *C. capsici* C13 และ *Cer. capsici* Ce9 ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 ppm

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส โรคใบจุดเชอร์โคสปอรา และโรครากและโคนเน่าของของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง พบว่าเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดเชอร์โคสปอราของพริกชี้ฟ้าได้เทียบเท่ากับการใช้คาร์เบนดาซิม ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ ยังมีประสิทธิภาพในลดการเกิดโรครากและโคนเน่าได้เทียบเท่ากับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน

จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ในทุกกรรมวิธีทดลองสามารถมีชีวิตรอดในสภาพแปลงปลูกเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ และมีจำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus* spp. ใกล้เคียงกันหลังฉีดพ่นหรือราดดินด้วยแบคทีเรียแขวนลอย จำนวน 8 ครั้ง โดยเฉพาะเชื้อ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนผลพริกชี้ฟ้าได้สูงสุด ในขณะที่เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนใบพริก และในดินบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้าได้สูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- จิรัสสา มีกลิ่นหอม วรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง พัชรา โพธิ์งาม และวาริน อินทนา. 2546. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก ใน รายงานการประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6. หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย, 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟิเทล ราชอาอคิต จังหวัดขอนแก่น : 391-401.
- จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2547. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา. 2540. พริก. ว.เกษตรก้าวหน้า 12 : 15-16.
- ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และนัฐพร จำปี. 2550. ผลของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8. อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี, 20-22 พฤศจิกายน 2550. โรงแรมอัมรินทร์ลาภูณ จังหวัดพิษณุโลก : 296-302.
- นลินี จาริกภกร พาณี หนูนิ่ม โสพนา วรฉัตรวิทยา อุทิศ ดวงสุวรรณ และมณูญ เอนกชัย. 2537. การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในสภาพไร่โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26. ว.วิชาการเกษตร 12 : 111-114.
- นรินาม. 2550. พริกขี้หนูลูกผสมรูปเปอร์ฮอท. ข่าวสารสรแดง 13 : 4-5.
- บุษราคัม อุดมศักดิ์ และณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2551. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8. อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี, 20-22 พฤศจิกายน 2550. โรงแรมอัมรินทร์ลาภูณ จังหวัดพิษณุโลก : 22-32.
- ประจวบ บุตรศาสตร์ นิพนธ์ ทวีชัย ขวลิต ฮงประยูร และ วิชัย โฆสิตรัตน. 2548. กลไกและการใช้เชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 : สาขาพืช, 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. กรุงเทพฯ : 240-247.
- พราวมาส เจริญรักษ์ จิระเดช แจ่มสว่าง วรณวิไล อินทนู และปราโมทย์ สฤกษ์นรินทร์. 2548. การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ฉีดพ่นใบมะเขือเทศเพื่อลดการเกิดโรคราคำภายใต้สภาพเรือนพลาสติก. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7. อารักขาพืช :

เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ : 359-369.

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาด้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต.

รัชฎาวรรณ เคชมนี สุพจน์ กาเซ็ม ญัฐธิญา เบือนสันเทียะ ชัยสิทธิ์ ปรีชา จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์ คุสิต อธิณุวัฒน์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. การเข้าครอบครองภายในและการชักนำความต้านทานของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ KPS46 บนพืชถั่วเหลือง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7. อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ : 524-541.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และจิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2548. การควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิชีวนะในสภาพแปลง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7. อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ : 305-317.

วรารักษ์ บุญเกิด จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2548. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* spp. ในรูปเชื้อสดและสารกรองเพื่อลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของผลพริก. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7. อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ : 262-273.

วรารักษ์ บุญเกิด จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2550. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อยับยั้งโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพเรือนทดลอง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8. อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี, 20-22 พฤศจิกายน 2550. โรงแรมอัมรินทร์ลาภู จังหวัดพิษณุโลก : 172-184.

สมใจ พิริยะสารณ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2546. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียจากดินปลวกที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อปฏิชีวนะและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชวงศ์อะเคเซีย. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6. หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย, 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟีเทล ราชอาอคิต จังหวัดขอนแก่น : 910-922.

- สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และสมบัติ ศรีขวงค์. 2546. การคัดเลือกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง. ว.เกษตร 19 : 176-188.
- สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุพจน์ กาเข้ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2546. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6. หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย, 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟิเทล ราชอาออคิด จังหวัดขอนแก่น : 910-922.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ชัยสิทธิ์ ปรีชา สุพจน์ กาเข้ม จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ และดุสิต อธิวันวัฒน์. 2548. การชักนำภูมิต้านทานและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดที่ผลิตเป็นการค้าด้วยแบคทีเรียควบคุมโรค. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7. อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิต และสิ่งแวดล้อม, 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลดส์ กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ : 482-496.
- เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2548. โรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. คู่มือการสอน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคผักและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : บริษัทแอคทีฟ พรินท์ จำกัด.
- ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. กรุงเทพฯ : บริษัทแอคทีฟ พรินท์ จำกัด.
- อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2544. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.
- อมรรัตน์ ชุมทอง. 2547. การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรดาร์บของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna Subterranea* (L.) Verde.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kühn. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Aktuganov, G.E., Galimzyanova, N.F., Melent'ev, A.I. and Kuz'mina, L.Y. 2007. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls. Microbiol. 76 : 413-420.
- Alvarez, A.M. and Nishijima, W.T. 1987. Postharvest diseases of papaya. Plant Dis. 71 : 681-686.

- Bertagnolli, B.L., Dal Soglio, F.K. and Sinclair, J.B. 1996. Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48 : 145-160.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B. and Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microb. Res.* 160 : 75-81.
- Collins, D.P. and Jacobsen, B.J. 2003. Optimize a *Bacillus* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol. Control* 26 : 153-161.
- Ekefan, E.J., Simons, S.A. and Nwankiti, A.O. 2000. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* (causal agent of yam anthracnose) in soil. *Trop. Sci.* 40 : 163-168.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Fravel, D.R. and Spurr, H.W. 1977. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *Mycoides* in a controlled environment. *Phytopathol.* 67 : 930-932.
- Gary, E.K. 2007. Enumeration of microorganisms. [Online] Available from : <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab4/lab4.html>. (accessed on 8th June, 2007)
- Ghai, S., Sood, S.S. and Jain, R.K. 2007. Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. *Ind. J. Microbiol.* 47 : 77-80.
- Guyot, J., Omanda, E.N., Ndoutoume, A., Otsaghe, A-A. M., Enjalric, F. and Assoumou, H-G.N. 2001. Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Prot.* 20 : 581-590.
- Hall, T.J. and Davis, W.E.E. 1990. Survival of *Bacillus subtilis* in silver and sugar maple seedlings over a two-year period. *Plant Dis.* 74 : 608-609.
- Jiang, Z.Q., Gue, Y.H., Li, S.M., Qi, H.Y. and Guo, J.H. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biol. Control* 36 : 216-223.
- Katz, E. and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41 : 449-474.

- Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol, W. and Jiménez-Díaz, R.M. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25 : 305-318.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enz. Microb. Technol.* 38 : 990-997.
- Mahadatanapuk, S., Sanguansermisri, M., Cutler, R.W., Sardud, V. and Anuntalabhochai, S. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 2 : 54-61.
- Miller, T.C. and Webster, R.K. 2001. Soil sampling techniques for determining the effect of cultural practices on *Rhizoctonia oryzae-sativae* inoculum in rice field soils. *Plant Dis.* 85 : 967-972.
- Okigbo, R.N. 2005. Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 159 : 307-314.
- Okoli, C.A.N. and Erinle, I.D. 2003. Comparative rate of rot-induction by nine fungal pathogens on stored tomato fruits in Nigeria. *J. Stored Prod. Res.* 26 : 77-79.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdar, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommès, J. and Thonart, P. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogen by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotech.* 67 : 692-698.
- Owolade, O.F., Akande, M.O., Alabi, B.S. and Adediran, J.A. 2006. Phosphorus level affects brown blotch disease, development and yield of cowpea. *World J. Agri. Sci.* 2 : 105-108.
- Paredes, B.S.G. and Muñoz, F.R. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Prot.* 21 : 11-15.
- Perez, C., Suarez, C. and Castro, G.R. 1992. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *J. Biotechnol.* 26 : 331-336.
- Pleban, S., Ingel, F. and Chet, I. 1995. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *Euro. J. Plant Pathol.* 101 : 665-672.

- Pring, R.J., Nash, C., Zakaria, M. and Bailey, J.A. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physio. Mole. Plant Pathol.* 46 : 137-152.
- Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23 : 97-129.
- Sanders, G.M. and Korsten, L. 2002. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol. Res.* 158 : 143-150.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Sánchez, P.C. and Candela, M.E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Euro. J. Plant Pathol.* 109 : 633-637.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* : DOI 10.1007/s11274-008-9680-z.
- Sivy, T.L., Shirk, M.C. and Fall, R. 2002. Isoprene synthase activity parallels fluctuations of isoprene release during growth of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 : 171-175.
- Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E. 1992. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York: Springer-Verlag.
- 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.
- Weller, D.M. and Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonad. *Phytopathol.* 73 : 463-469.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

2. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

3. Nutrient glucose agar (NGA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

4. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

5. V8 Juice Agar (VA)

V8 Juice	200	มิลลิลิตร
CaCO ₃	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การทดสอบปฏิกิริยาแกรมและการสร้างเอนโดสปอร์

1. การทดสอบปฏิกิริยาแกรม

streak เชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูป เขี่ยเชื้อแบคทีเรียวางลงบนสไลด์ และหยด KOH 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อแบคทีเรีย ใช้ลูปคนเชื้อแบคทีเรียและ KOH 3 เปอร์เซ็นต์ ให้เข้ากัน ยกดูขึ้นมากตรง ๆ หากเชื้อแบคทีเรียเหนียวติดลูป อ่านผลเป็นบวก แสดงว่าแบคทีเรานั้นเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่ถ้าเชื้อแบคทีเรียไม่ติดลูป อ่านผลเป็นลบ แสดงว่าแบคทีเรานั้นเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

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
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

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

2.2 วิธีการย้อมเอนโดสปอร์

streak เชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมา smear ลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง หยด malachite green 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วม นำสไลด์ไปอังบนไอน้ำร้อน คอยเติม malachite green อย่าให้สีแห้ง เป็นเวลา 10 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำไหล ปล่อยให้แห้ง ย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 วินาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำไหล ซับให้แห้ง ตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียติดสีแดงของ safranin-O ในขณะที่สปอร์ของแบคทีเรียติดสีเขียวของ malachite green

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียม Mc Farland Standard

barium chloride	0.05 M BaCl ₂ (1.175% w/v BaCl ₂ .2H ₂ O)
sulfuric acid	0.36 M H ₂ SO ₄ (1.00% w/v)

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียม Mc Farland Standard เบอร์ต่าง ๆ

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 รหัสของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืช และดินจากแปลง
เกษตรกร

รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	ตัวอย่างที่แยก	แหล่งที่มา
DFBK	15	ผลเป็นโรค	อ.บางกล้า จ.สงขลา
DFHY	1	ผลเป็นโรค	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
DFNY	7	ผลเป็นโรค	อ.นาโยง จ.ตรัง
DFP	3	ผลเป็นโรค	อ.ประทีป จ.ชุมพร
DFRN	68	ผลเป็นโรค	อ.ระโนด จ.สงขลา
DFRP	25	ผลเป็นโรค	อ.รัตภูมิ จ.สงขลา
DFTC	5	ผลเป็นโรค	อ.ท่าชนะ จ.ชุมพร
DFVS	3	ผลเป็นโรค	อ.เวียงสระ จ.ชุมพร
DFYT	4	ผลเป็นโรค	อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง
DLBK	6	ใบเป็นโรค	อ.บางกล้า จ.สงขลา
DLHC	5	ใบเป็นโรค	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช
DLNY	5	ใบเป็นโรค	อ.นาโยง จ.ตรัง
DLP	5	ใบเป็นโรค	อ.ประทีป จ.ชุมพร
DLRN	9	ใบเป็นโรค	อ.ระโนด จ.สงขลา
DLTB	5	ใบเป็นโรค	อ.ตากใบ จ.นราธิวาส
FBK	6	ผลปกติ	อ.บางกล้า จ.สงขลา
FHC	1	ผลปกติ	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช
FHY	4	ผลปกติ	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
FNY	10	ผลปกติ	อ.นาโยง จ.ตรัง
FP	2	ผลปกติ	อ.ประทีป จ.ชุมพร
FRN	16	ผลปกติ	อ.ระโนด จ.สงขลา
FYT	6	ผลปกติ	อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง
LBK	40	ใบปกติ	อ.บางกล้า จ.สงขลา
LHC	2	ใบปกติ	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช

รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	ตัวอย่างที่แยก	แหล่งที่มา
LHY	15	ไบปกติ	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
LLS	1	ไบปกติ	อ.หลังสวน จ.ชุมพร
LNY	11	ไบปกติ	อ.นาโยง จ.ตรัง
LP	3	ไบปกติ	อ.ประทิว จ.ชุมพร
LSV	3	ไบปกติ	อ.สวี จ.ชุมพร
LTB	6	ไบปกติ	อ.ตากใบ จ.นราธิวาส
LTC	2	ไบปกติ	อ.ท่าชนะ จ.ชุมพร
LTK	4	ไบปกติ	อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร
LYT	2	ไบปกติ	อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง
SBK	42	ดิน	อ.บางกล่ำ จ.สงขลา
SCA	21	ดิน	อ.ชะอวด จ.ชุมพร
SHC	9	ดิน	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช
SHY	13	ดิน	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
SKP	6	ดิน	อ.เขาพนม จ.ชุมพร
SNY	9	ดิน	อ.นาโยง จ.ตรัง
SPT	137	ดิน	อ.เมือง จ.พัทลุง
SRN	35	ดิน	อ.ระโนด จ.สงขลา
SSK	1	ดิน	อ.เมือง จ.สงขลา
STB	21	ดิน	อ.ตากใบ จ.นราธิวาส
STC	5	ดิน	อ.ท่าชนะ จ.ชุมพร
SVS	8	ดิน	อ.เวียงสระ จ.ชุมพร

ภาคผนวก จ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* C13 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
91.00-100 เปอร์เซ็นต์ ($r=0.63-0.00$ cm)	การครอบครองพื้นที่ LBK2.6, LBK2.8, SHY5 (3 ไอโซเลท)
81.00-90.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=1.33-0.63$ cm)	การครอบครองพื้นที่ DFRN2.1.2.1, DFRN2.1.2.3, DLBK1.1, DLRN2.1, FRN1.1.1, FRN64.1.2, LBK2.7, LBK3.2, SBK6.3, SHY2, SHY6, SPT35.1.4, SRN28 (13 ไอโซเลท)
71.00-80.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.03-1.33$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN3.2.1, DFRN3.2.2, DFRN5.1.2, DFRN5.2.1, DFRN6.1.1, DFRN6.1.2, DFRN6.2.1, DFRN6.2.3, DFRN6.2.5, DFRN6.4.3, DFRN7.1.3, DFRN7.2.2, DFRN8.1.2, DFRN8.2.1, DFRN9.1.1, DFRN9.2.2, DFRN9.2.3, DFRN10.1.3, DFRN10.1.4, DFRN10.1.5, DFRN11.1.1, DFRN12.1.1, DFRN14.1.4, DFRN15.1.1, DFRN15.2.1, DFRN16.2.3, DFRN17.1.2, DFRN17.2.2, DFRN17.3.2, DFRN18.1.1, DFRN18.1.2, DFRN18.2.2, DFRN21.1.1, DFRN21.1.2, DFRP7.1, DFRP1.3, DFYT1.2, DFVS1.3, DLBK1.2, DLBK2.1, DLBK2.2, DLBK3.2, DLHC2.1, DLHC2.2, DLHC2.3, DLHC3.2, DLNY1.2, DLNY1.5, DLNY2.2, DLNY2.3, DLP1.1, DLP1.3, DLP1.4, DLP1.5, DLRN1.3, DLRN1.5, DLRN2.3, DLTB1.2, DLTB1.3, DLTB1.4, DLTB2.1, FBK2.1, FBK2.3, FHY1.2, FHY2.1, FHY2.3, FNY2.9, FP1, FP3, FRN1.1.2, FRN1.1.3, FRN1.2.1, FRN1.2.2, FRN1.2.3, FRN1.2.5, FRN1.2.9,

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
71.00-80.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.03-1.33$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง (ต่อ)
	FYT1.1, FYT1.2, FYT1.3, FYT1.7, LBK1.1, LBK1.3, LBK1.4, LBK1.9, LBK2.1, LBK2.2, LBK2.5, LBK4.1, LBK4.5, LHY1.1, LHY1.4, LHY2.1, LHY2.2, LHY2.4, LHY2.5, LHY3.1, LHY3.1, LNY2.2, LTB1, LTB2, LTB4, LTB6, LTB9, LTC3.1, LTC3.3, LYT1.1, SBK1.3, SBK5.1, SBK5.3, SBK5.5, SBK5.6, SBK5.7, SBK6.5, SCA5.6, SCA5.7, SCA5.12, SCA5.13, SHC3.5, SHC3.6, SHC3.7, SHY3, SHY9, SHY10, SHY11, SHY12, SNY1.1, SNY2.2, SNY2.3, SNY2.4, SPT30.3.2, SPT30.3.3, SPT32.1, SPT32.2.1, SPT33.1.1, SPT35.1.2, SPT35.2.1, SPT35.2.2, SPT36.2.3, SPT36.3.1, SPT36.3.2, SPT36.3.3, SPT37.1.1, SPT37.2.4, SPT37.2.5, SPT38.1.1, SPT39.3.4, SPT39.1.1, SPT41.1.4, SPT41.1.5, SPT42.2.1, SPT42.3.1, SPT42.3.2, SPT43.1.8, SPT44.3.8, SPT45.1.1, SPT45.1.2, SPT45.1.3, SPT46.1.1, SPT46.3.1, SPT46.3.2, SRN4, SRN5, SRN8, SRN10, SRN15, SRN23, SRN24, SRN27, SRN29, SRN38, SRN39, SRN42, SRN44, SRN45, STB21, STB24, STB39, STB42, STB45, STB70.1.1, STB70.1.2, STB70.2.1, STB71.1.1, STB72.2, STB73.2.1, STB73.2.3, STB75.1.1, STB75.2.1, STB76.2.1, STB78.2.1, STB78.2.2 (191 ไอ โซเลท)
	การครอบครองพื้นที่
	DFBK2.2, DFBK2.3, DFBK2.5, DFBK2.6, DFHY1, DFNY1.1, DFNY1.3, DFNY1.4, DFNY1.2, DFNY1.3, DFRN2.1.2.2, DFRN2.1.2.5, DFRN3.1.1, DFRN3.1.2, DFRN3.2.2, DFRN4.1.1, DFRN4.1.2, DFRN5.1.1, DFRN5.1.3, DFRN5.2.2, DFRN6.2.2, DFRN7.1.1,

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
71.00-80.99 เปอร์เซ็นต์ (r=2.03-1.33 cm)	การครอบครองพื้นที่ (ต่อ) DFRN7.2.1, DFRN8.1.1, DFRN9.1.3, DFRN9.1.5, DFRN9.2.1, DFRN9.2.3, DFRN10.1.2, DFRN14.1.1, DFRN15.1.2, DFRN15.2.2, DFRN16.1.1, DFRN16.1.2, DFRN17.1.1, DFRN17.2.1, DFRN21.1.3, DFRP3.4, DFYT1.4, DLBK3.1, DLRN1.4, DLRN2.2, DLRN3.1, DLRN3.3, DLHC1.1, DLNY1.2, DLP2.1, DLTB1.5, FHY2.2, FNY2.1, FNY2.2, FNY2.3, FNY2.4, FNY2.7, FNY1.10, FRN2.2.1, FRN61.2, FRN64.1.2, FRN65.1.1, FRN66.1.1, FRN66.1.3, FRN68.1, LBK1.10, LBK1.6, LBK2.9, LBK3.1, LBK3.4, LBK3.5, LBK3.7, LBK3.8, LHC3, LHC5, LLS1, LNY2.7, LNY2.9, LNY2.10, LP2, LHY3.1, LHY3.3, LHY4.4, LHY4.5, LHY5.1, LHY5.3, LHY5.5, LTB13, LTK1.2, LYT1.3, SBK2.2, SBK2.3, SBK2.5, SBK3.3, SBK3.4, SBK3.5, SBK5.2, SCA5.1, SCA5.2, SCA5.5, SCA5.9, SCA5.10, SCA5.14, SCA5.15, SCA6.1, SHC3.1, SHC3.2, SHC3.3, SHC3.4, SHY8, SHY7, SNY1.4, SRN1, SRN2, SRN3, SRN6, SRN7, SRN11, SRN14, SRN16, SRN17, SRN18, SRN19, SRN20, SPT33.1.4, SPT33.2.3, SPT34.1.6, SPT34.3.1, SPT37.1.3, SPT37.2.1, SPT37.2.2, SPT37.2.3, SPT39.1.2, SPT39.2.3, SPT39.3.2, SPT41.1.1, SPT41.1.2, SPT41.3.1, SPT41.3.2, SPT41.2.4, SPT41.3.4, SPT42.2.2, SPT42.2.3, SPT42.2.4, SPT43.1.1, SPT43.1.2, SPT43.1.6, SPT43.2.1, SPT44.3.4, SPT44.3.5, SPT44.3.6, SPT44.3.7, SPT44.3.9, SPT45.1.4, SPT45.2.1, SPT45.3.1, SPT45.3.2, SPT46.1.2, SPT46.2.1, STB21, SVS2.1, SVS2.3, SVS2.6, SVS2.8 (161 ไอโซเลท)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
61.00-70.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.73-2.03$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN2.1.1, DFRN2.1.2, DFRN7.1.3, DFRN9.2.3, DFRN12.1.2, DFRP2.1, DFRP2.2, DFRP3.2, DFRP4.2, DFRP4.3, DFRP4.4, DFRP4.6, DFRP5.1.1, DFRP5.3, DFRP5.5, DFRP6.1, DFRP8.1, DFVS1.2, DFYT1.1, DFYT1.3, DLRN1.1, FBK2.2, FBK2.4, FBK2.5, FBK2.6, FNY2.5, FYT1.4, FYT1.5, LBK1.5, LBK1.7, LBK1.8, LBK2.3, LBK2.4, LBK4.2, LBK4.3, LBK4.4, LBK4.7, LNY2.4, LNY2.8, LNY11.1, LNY11.2, LTK1.1, LTK1.4, SBK1.1, SBK1.4, SBK1.8, SBK5.4, SBK5.8, SBK6.1, SBK6.2, SBK6.4, SBK6.6, SCA4.2, SCA5.3, SCA5.4, SCA5.6, SCA5.11, SHY1, SHY4, SNY1.3, SNY2.1, SPT30.1.1, SPT30.1.2, SPT30.2.5, SPT30.3.1, SPT31.3.1, SPT32.2.2, SPT32.2.3, SPT32.2.4, SPT32.2.6, SPT33.1.3, SPT33.2.1, SPT33.2.2, SPT34.1.1, SPT34.3.2, SPT34.3.3, SPT36.1.1, SPT36.1.2, SPT36.1.6, SPT36.3.4, SPT39.3.3, SPT41.1.3, SPT43.1.4, SPT43.1.6, SRN9, SRN21, SRN22, SRN25, SRN26, SRN32, SRN35, SSK1, SSVS1.1, SSVS1.2, SSVS1.4, SSVS1.5, STB12, STC1 (98 ไอโซเลท)
61.00-70.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.73-2.03$ cm)	การครอบครองพื้นที่ DFBK2.1, DFBK2.4, DFNY1.4, DFNY1.5, DFP1.1, DFP1.2, DFP1.3, DFRP1.1, DFRP1.2, DFRP1.5, DFRP2.3, DFRP3.3, DFRP3.5, DFRP4.1 FNY2.5, FNY2.6, LBK3.3, LBK3.6, LBK3.9, LNY2.5, LNY2.6, LP1, LP2, LSV1, LSV2, LTK1.3, LSV3, SBK2.1, SBK2.2, SBK2.4, SCA5.8, SCA6.2, SCA6.3, SHY7.1, SPT30.2.1, SPT30.2.3, SPT30.2.4, SPT31.2.1, SPT34.1.3, SPT34.1.5, SPT34.2.2, SPT34.2.3, SPT36.1.4.1, SPT36.1.5, SPT37.1.2 (48 ไอโซเลท)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
51.00-60.99 เปอร์เซ็นต์ ($r > 3.46-2.73$ cm)	<p data-bbox="722 407 953 444">การเกิดบริเวณยับยั้ง</p> <p data-bbox="479 466 1200 1019">DFRP3.1, DFRP5.2, DFRP5.4 DFVS1.1, FHC1, LBK1.2, LBK3.10, LBK4.6, LNY2.3, SBK1.2, SCA4.1, SHC1.1, SHC1.2, SRN13, SNY1.2, SNY3.1, SPT30.2.2, SPT31.2.2, SPT34.1.2, SPT34.2.1, SPT36.1.3, SPT36.1.4.2, SPT36.1.7, SPT36.2.1, SPT36.2.2, SPT37.1.4, SPT38.1.2, SPT38.1.3, SPT42.3.4, SPT43.1.3, SPT43.1.5, SPT43.1.7, SPT43.1.9, SPT43.2.2, SPT44.1.1, SPT44.1.2, SPT44.1.3, SPT44.1.4, SPT44.1.5, SPT44.1.6, SPT44.2.1, SPT44.2.2, SPT44.2.3, SPT44.2.4, SPT44.2.5, SPT44.3.1, SPT44.3.2, SPT44.3.3, SPT46.2.7, STB11 (49 ไอโซเลท)</p> <p data-bbox="722 1041 962 1086">การครอบครองพื้นที่</p> <p data-bbox="479 1108 1200 1263">DFBK3.7, DFBK3.9, DFTC1.4, LBK1.12, LBK1.13, SBK7.2, SBK7.4, SBK4.1, SBK4.3, SBK4.7, SBK1.5, SBK1.6, SPT33.1.2, SPT34.1.4, SPT44.3.10, STB10 (16 ไอโซเลท)</p>
น้อยกว่า 50.99 เปอร์เซ็นต์ ($r > 3.43$ cm)	<p data-bbox="722 1285 962 1329">การเกิดบริเวณยับยั้ง</p> <p data-bbox="479 1351 1200 1550">DFBK2.7, DFBK2.8, DFBK3.1, DFBK3.2, DFBK3.3, DFBK3.4, DFBK3.5, DFTC1.3, DFTC1.5, LBK1.11, LBK1.14, SBK1.7, SBK7.1, SBK7.6, SBK4.2, SBK4.4, SKP2, SKP3 (18 ไอโซเลท)</p> <p data-bbox="722 1572 962 1616">การครอบครองพื้นที่</p> <p data-bbox="479 1639 1200 1727">DFTC1.1, DFTC1.2, SBK4.5, SBK4.6, SKP1, SKP4, SKP5, SKP6, STC2.1, STC2.2, STC3.2, STC3.4 (12 ไอโซเลท)</p>

ตารางภาคผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* S7 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย
	ไอโซเลท (จำนวน)
71.00-80.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.03-1.33$ cm)	การครอบครองพื้นที่ LBK1.10, LBK2.6, SPT37.1.2 (3 ไอโซเลท)
61.00-70.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.73-2.03$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN14.1.1, SBK5.7, SPT36.1.1, SPT37.1.4, SPT43.1.9 (5 ไอโซเลท) การครอบครองพื้นที่ SPT33.1.2, SPT36.1.4.1 (2 ไอโซเลท)
51.00-60.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=3.43-2.73$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง SHY1, SHY8, SHY10, SHY11, SPT30.3.2, SPT32.2.4, SPT33.2.2, SPT34.3.2, SPT36.1.4.2, SPT36.2.3, SPT37.2.4, SPT37.2.5, SPT39.3.4, SPT41.1.3, SPT44.3.8, SRN9, SRN10, SRN23, SRN27, STB70.2.1, STB71.1.1, STB72.2, STB78.2.1 (23 ไอโซเลท) การครอบครองพื้นที่ DFRP1.2, DFRP2.3, SHY7, SPT37.2.1, SPT37.2.3, SPT44.3.5, SRN14 (7 ไอโซเลท)
41.00-50.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=4.13-3.43$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN5.1.2, DFRN6.2.1, DFRN8.1.1, DFRN9.1.1, DFRP5.1.1, DFYT1.2, FNY2.3, FNY2.9, LNY2.8, LTB1, LTB4, SBK5.3, SHY3, SHY9, SHY12, SNY1.2, SPT35.1.1, SPT36.1.2, SPT36.1.6, SPT32.2.1, SPT32.2.2, SPT34.1.2, SPT33.1.3, SPT36.3.4, SPT41.1.5, SPT42.3.2, SPT42.3.3, SPT42.3.1, SPT43.1.2, SPT43.1.4, SPT46.3.1, SRN3, SRN4, SRN6, SRN8, SRN11, SRN21, SRN22, SRN26, SRN28, SRN29, SRN32, STB11, STB21, STB24, STB42, STB70.1.1,

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
41.00-50.99 เปอร์เซ็นต์ (r=4.13-3.43 cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง STB70.1.2, STB78.2.2 (49 ไอโซเลท)
41.00-50.99 เปอร์เซ็นต์ (r=4.13-3.43 cm)	การครอบครองพื้นที่ DFRN6.2.2, DFRN7.2.1, DFRP1.5, DFYT1.4, FNY2.1, FNY2.2, LBK2.8, LBK2.9, LBK4.5, LNY2.9, SBK2.5, SHY2, SHY6, SPT30.2.1, SPT34.1.3, SPT34.3.1, SPT36.1.3, SPT36.1.5, SPT36.3.3, SPT39.1.1, SPT39.3.2, SPT41.1.2, SPT43.1.1, SPT41.3.1, SPT42.2.2, SPT42.2.4, SPT44.3.4, SPT46.3.2, SRN2, SRN16, SRN17, SRN19, SRN20, STB10 (34 ไอโซเลท)
31.00-40.99 เปอร์เซ็นต์ (r=4.83-4.13 cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN3.2.1, DFRN5.2.1, DLBK2.1, DLHC2.2, DLNY2.2, DLRN1.3, DLRN1.5, LBK1.1, LBK4.1, SBK5.1, SPT35.2.2, SPT36.3.1, SPT37.1.1, SPT41.1.4, SPT42.2.1, SRN13, STB12, STB75.1.1, STB75.2.1, STB76.2.1 (20 ไอโซเลท) การครอบครองพื้นที่ FNY1.10, FNY2.4, SBK5.2, SPT33.1.4, SPT34.1.6, SPT34.2.2, SPT39.1.2, SPT41.3.2, SPT46.2.1, SRN1, SRN5, SRN18, STB39 (13 ไอโซเลท)
30.00-21.99 เปอร์เซ็นต์ (r= 4.90-5.46cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRP2.1, DFRP2.2, DFRP4.2, DFRP4.4, DFRP4.6, DFRP5.2, DFRP5.3, DFRP5.5, DFRP6.1, DFRP8.1, DLHC2.1, DLHC2.3, DLHC3.2, DLP1.4, DLP1.5, DLRN1.1, DLRN7.3, DLTB1.2, DLTB1.4, DLTB2.1, SHY4 (21 ไอโซเลท)
30.00-21.99 เปอร์เซ็นต์ (r= 4.90-5.46cm)	การครอบครองพื้นที่ DFRP3.4, DFRP1.1, DFRP3.3, DLRN1.1, DLRN1.4, DLRN2.2, DLRN2.3, DLRN3.1, DLRN3.2, DLRN3.3, LBK2.7 (11 ไอโซเลท)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Cercospora capsici* Ce9 โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลต (จำนวน)
91.00-100 เปอร์เซ็นต์ ($r=0.63-0.00$ cm)	การครอบครองพื้นที่ DFRN6.2.2, DFRN7.2.1, DFRP1.2, DFRP2.3, DFYT1.4, LBK1.10, LBK2.6, LBK2.8, LBK2.9, LBK4.5, LNY2.9, SHY7, SPT33.1.2, SPT36.1.4.1, SPT37.1.2, SPT37.2.1, SPT37.2.3, SPT41.3.2, SPT44.3.4, SPT44.3.5, SRN14 (21 ไอโซเลต)
81.00-90.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=1.33-0.63$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRN5.1.2, DFRN5.2.1, DFRN6.2.1, DFRN14.1.1, DFYT1.2, DFRN8.1.1, DFRP5.1.1, DFRN9.1.1, DLNY2.2, DLHC2.2, DLRN1.3, DLBK2.1, DLRN1.5, FNY2.3, FNY2.9, LBK1.1, LBK4.1, LNY2.8, LTB1, LTB4, SBK5.1, SBK5.3, SBK5.7, SHY1, SHY3, SHY8, SHY9, SHY10, SHY11, SHY12, SNY1.2, SPT30.3.2, SPT32.2.1, SPT32.2.2, SPT32.2.4, SPT33.1.3, SPT33.2.2, SPT34.1.2, SPT34.3.2, SPT35.1.1, SPT35.2.2, SPT36.1.1, SPT36.1.2, SPT36.1.6, SPT36.2.3, SPT36.3.1, SPT36.3.4, SPT37.1.1, SPT37.1.4, SPT37.2.4, SPT37.2.5, SPT39.3.4, SPT41.1.3, SPT41.1.4, SPT41.1.5, SPT42.2.1, SPT42.3.1, SPT42.3.2, SPT42.3.3, SPT43.1.2, SPT43.1.4, SPT43.1.9, SPT44.3.8, SPT46.3.1, STB11, STB21, STB24, STB42, STB70.1.1, STB70.1.2, STB70.2.1, STB71.1.1, STB72.2, SRN3, SRN4, SRN6, SRN8, SRN9, SRN10, SRN11, SRN21, SRN22, SRN23, SRN26, SRN27, SRN28, SRN29, SRN32, STB75.1.1, STB75.2.1, STB76.2.1, STB78.2.1, STB78.2.2 (93 ไอโซเลต)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไอโซเลท (จำนวน)
81.00-90.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=1.33-0.63$ cm)	การครอบครองพื้นที่ DFRP1.5, FNY1.10, FNY2.1, FNY2.2, FNY2.4, SBK2.5, SBK5.2, SHY2, SHY6, SPT30.2.1, SPT33.1.4, SPT34.1.3, SPT34.1.6, SPT34.2.2, SPT34.3.1, SPT36.1.3, SPT36.1.5, SPT36.3.3, SPT39.1.1, SPT39.1.2, SPT39.3.2, SPT41.1.2, SPT41.3.1, SPT42.2.2, SPT42.2.4, SPT43.1.1, SPT46.2.1, SPT46.3.2, SRN1, SRN2, SRN16, SRN17, SRN19, SRN20, STB10, STB39 (36 ไอโซเลท)
71.00-80.99 เปอร์เซ็นต์ ($r=2.03-1.33$ cm)	การเกิดบริเวณยับยั้ง DFRP2.1, DFRP2.2, DFRP4.2, DFRP4.4, DFRP4.6, DFRP5.2, DFRP5.3, DFRP5.5, DFRP6.1, DFRP8.1, DFRN3.2.1, DLBK1.2, DLP1.5, DLHC2.1, DLHC2.3, DLHC3.2, DLP1.3, DLP1.4, DLRN1.1, DLTB1.2, DLTB2.1, SHY4, SPT36.1.4.2, SRN13, STB12 (25 ไอโซเลท) การครอบครองพื้นที่ DFRP1.1, DFRP3.3, DFRP3.4, DLRN1.1, DLRN1.4, DLRN2.2, DLRN2.3, DLRN3.1, DLRN3.2, DLRN3.3, LBK2.7, SRN5, SRN18 (13 ไอโซเลท)

ตารางภาคผนวกที่ 6 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนใบพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

สายพันธุ์เชื้อ	จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ($\times 10^4$ cfu/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus</i> spp.								
SBK5.7	0.05	0.32	0.82	2.80	3.60	5.40	6.90	8.40
SPT41.1.3	0.04	0.34	0.69	2.50	3.30	4.50	6.80	7.10
SBK5.7+SPT41.1.3	0.03	0.30	0.55	1.90	3.10	4.30	6.10	6.20

ตารางภาคผนวกที่ 7 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดบนผลพริกชี้ฟ้า หลังฉีดพ่นเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน

สายพันธุ์เชื้อ	จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ($\times 10^4$ cfu/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus</i> spp.								
SBK5.7	-	-	-	0.030	0.034	0.033	0.036	0.035
SPT41.1.3	-	-	-	0.032	0.037	0.035	0.038	0.036
SBK5.7+SPT41.1.3	-	-	-	0.030	0.033	0.032	0.035	0.033

ตารางภาคผนวกที่ 8 จำนวนประชากรเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ที่มีชีวิตอยู่รอดในดินบริเวณรอบ ๆ โคนต้นพริกชี้ฟ้า หลังรดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* spp. ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

สายพันธุ์เชื้อ	จำนวนประชากรเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ($\times 10^4$ cfu/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus</i> spp.								
SBK5.7	8.10	9.60	16.10	24.70	25.10	26.10	27.30	32.00
SPT41.1.3	7.40	8.90	17.30	22.40	23.00	24.20	25.10	29.10
SBK5.7+SPT41.1.3	7.10	8.70	16.00	19.90	21.20	23.10	23.50	23.70

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรกโนส

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	3342.5	835.625	32.877049*
Error	15	381.25	25.416667	
Total	19	3723.75		

C.V. 8.03%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียมเชื้อรา

Colletotrichum capsici C13

Source	df	SS	MS	F
Treatment	22	16219.573	737.253	1832.787*
Error	46	18.504	0.402	
Total	68	16238.077		

C.V. 2.40%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียมเชื้อรา

Cercospora capsici Ce9

Source	df	SS	MS	F
Treatment	22	77153.78491	3506.99022	8739.231*
Error	46	18.45946667	0.40129275	
Total	68	77172.24438		

C.V. 1.54%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 12 วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของ โคนิเดียมเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

C13

Source	df	SS	MS	F
Treatment	22	123990.6	5635.935441	338.1561265*
Error	46	766.6667	16.66666667	
Total	68	124757.2		

C.V. 6.94%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 13 วิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของ โคนิเดียมเชื้อรา *Cercospora capsici*

Ce9

Source	df	SS	MS	F
Treatment	22	2004323.913	91105.632	1722.271*
Error	46	2433.333	52.899	
Total	68	2006757.246		

C.V. 3.62%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	5.692	1.423	85.380*
Error	15	0.250	0.017	
Total	19	5.942		

C.V. 6.90%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางผนวกที่ 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรคใบจุดเซอร์คอสปอราของพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	2182.5	545.625	72.75*
Error	15	112.5	7.5	
Total	19	2295		

C.V. 6.15%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 16 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	34146.95	8536.737	286.526*
Error	15	446.9086	29.7939	
Total	19	34593.86		

C.V. 7.80%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 17 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	1142.5	285.625	8.359756*
Error	15	512.5	34.16666667	
Total	19	1655		

C.V. 12.57%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 18 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตพริกชี้ฟ้า (ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่า)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	42610.81	10652.7	65.59943*
Error	15	2435.853	162.3902	
Total	19	45046.66		

C.V. 3.82%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 19 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนเมล็ดสเคลอโรเทียมบริเวณโคนต้นพริกชี้ฟ้า

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	619.25	28787.13	697.3062*
Error	15	404969	41.28333	
Total	19	163967.9583		

C.V. 5.34%

*แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวปฎิมาพร ปลอดภัย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910620034

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

วิทยาศาสตรบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)

ชื่อสถาบัน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปีที่สำเร็จการศึกษา

2548