ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น

Efficacy of Antagonistic Microorganisms for the Control of Grape Anthracnose

นามผู้วิจัย นางสาวจุฑารัตน์ เพชรแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น

Efficacy of Antagonistic Microorganisms for the Control of Grape Anthracnose

โดย

นางสาวจุฑารัตน์ เพชรแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุฑารัตน์ เพชรแก้ว 2554: ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ด. 108 หน้า

คัดเลือกเชื้อรา 24 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท และยีสต์ 8 ไอโซเลท จากจุลินทรีย์ 90 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผิวใบองุ่น มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น ด้วยวิธี Dual culture test พบว่าเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ 25.33-65.60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 0-55.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงบางไอโซเลท จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพไปทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา พบว่าเชื้อราไอโซเลท DLP 8-3 Epi 3-2 แบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(2) และยีสต์ไอโซเลท Epi 3(2) สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นได้ 86.90 74.60 86.90 และ 78.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ด้วยวิธี Dual culture test บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 43.74-49.38 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ PM 9 มีประสิทธิภาพยับยั้งสูงที่สุด คือ 49.38 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ด้วยวิธี spot inoculation บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 41.64-64.15 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ดั้งเดิม 6 ไอโซเลท และสายพันธุ์กลาย 6 ไอโซเลท เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่น พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่า 74.30-93.42 เปอร์เซ็นต์ ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในสภาพแปลงปลูกที่จังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2553 พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท BB 165 และ ไอโซเลท Endo 2(2) บนผิวของใบและผลองุ่นมากสุด ถึงแม้จะไม่พบอาการโรคแอนแทรคโนสและโรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia fruit rot) บนผลองุ่น แต่พบว่าระดับการเกิดโรคผลเน่า (Bitter rot) ลดลง ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดสอบในสภาพแปลงปลูก ระหว่างเดือนพฤษภาคม-กันยายน 2553 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการครอบครองกิ่งองุ่นได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165 ตรวจพบปริมาณเชื้อบนใบองุ่นมากที่สุด จากการประเมินระดับอาการเกิดโรค พบโรคผลเน่า (Bitter rot) และโรคผลเน่าดำ (Black mold rot) ในทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบ ขณะที่โรคแอนแทรคโนสและโรคผลเน่าดำกำมะหยี่พบในบางกรรมวิธี โดยระดับอาการของโรคทุกโรคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jutarat Petchkeaw 2011: Efficacy of Antagonistic Microorganisms for the Control of Grape Anthracnose. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 108 pages.

Ninety epiphytic microorganisms isolated from the leaf surface of grape including 24 isolates of fungi, 15 isolates of bacteria and eight isolates of yeasts were evaluated for the inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose on grape by dual culture technique. Fungal and bacterial isolates inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides* by 25.33 – 65.60 and 0-55.67 %, respectively. Only some isolates of yeasts inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides*. Some promising isolates of antagonistic microorganisms were screened for the control of anthracnose on the detached fruits of grape (cv. White Malaka). The results revealed that two fungal isolates (DLP 8-3 and Epi 3-2), a bacterial isolate (Endo 2(2)) and a yeast isolate (Epi 3(2)) effectively controlled anthracnose on grape's fruits with 86.90, 74.60, 86.90 and 78.96% of disease suppression, respectively. From dual culture test on PDA medium, five strains of *Trichoderma harzianum* inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides* by 43.74-49.38 %. Strain PM9 was the most effective isolate with 49.38% of inhibition. The efficacy of antagonistic *Bacillus* from spot inoculation on PDA medium showed that six isolates of *Bacillus* spp. inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides* by 41.64-64.15 %. *Bacillus* sp. isolate Endo 2(2) was the most effective isolate with 64.15 % of inhibition. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (5 strains), *Bacillus* spp. wild type (6 isolates) and mutant (6 isolates) were evaluated for the suppression of anthracnose incidence on harvested White Malaka fruits. All antagonists effectively suppressed fruit rot by 74.30-93.42 %. Efficacy of antagonistic microorganisms for the control of anthracnose on grape fruits was determined at the commercialized production orchard in Ratchaburi Province during March and April, 2010. The results revealed that high populations of antagonistic *Bacillus* isolates BB165 and Endo 2(2) were detected on leaves and fruits surface. Although anthracnose and Lasiodiplodia fruit rot could not be found, the bitter rot incidence was significantly reduced as compared to the control. For the experiment during May and September, 2010, antagonistic *Bacillus* isolate Endo 2(2) effectively colonized the grape branches, while isolate BB165 was mostly detected on grape leaves. Incidences of black mold rot and bitter rot were slightly found in all treatments whereas, anthracnose and Lasiodiplodia fruit rot were observed in some treatments. All disease incidences were not significantly different when compared to the control.

_____ / ____ / ____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณวิไล อินทนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การดำเนินชีวิต และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตรจารย์ ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและหัวหน้าโครงการวิจัยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขององุ่น ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย แนะแนวทางในการทดลองมาโดยตลอด และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คนึงนิตย์ เหรียญวรากร ประธานการสอบ และ ดร. รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทาน ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับทุนอุดหนุนวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนสารเคมีและเครื่องมือในการวิจัยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการไตเตรทสาร ขอขอบคุณ คุณบุญส่ง ธรรมรักษากุล เจ้าของแปลงองุ่นที่สนับสนุนแปลงทดลองในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อสอนและคุณแม่จินดา เพชรแก้ว ตลอดจนทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ แห่งห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสนทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อ และเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ครอบครัว อาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

จุฑารัตน์ เพชรแก้ว

ตุลาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	84
สรุปและข้อเสนอแนะ	90
สรุป	90
ข้อเสนอแนะ	91
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	93
ภาคผนวก	104
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของจุลินทรีย์ ชื่อทางการค้า และการอ้างอิงถึงกลไกของจุลินทรีย์ของ biofungicide ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในองุ่น	17
2	ชนิดและจำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบองุ่นด้วยวิธีการต่าง ๆ	35
3	รัศมีโคโลนี และประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากใบองุ่นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อรา บนอาหาร potato dextrose agar 10 วัน	37
4	รัศมีโคโลนี และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ของยีสต์ และแบคทีเรียที่แยกได้จากใบองุ่นด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 10 วัน	41
5	พื้นที่แผลบนผลองุ่น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบองุ่น เมื่อปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.)ไปแล้ว 7 วัน	45
6	ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ต่าง ๆ (Th) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน	48
7	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ (Bs) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี spot inoculation หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน	50
8	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่ต้านทาน rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี spot inoculation หลังวางเชื้อรา บนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน	53

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) แบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ดั้งเดิม (Bs) และ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย (Bs-M) ต่อพื้นที่แผลบนผลองุ่น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา และค่า total soluble solid (TSS) หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 5 วัน	56
10	ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) บนใบ และผิวผลองุ่นหลังจากพ่นเชื้อครั้งที่ 1 ครบ 14 วัน หลังพ่นเชื้อครั้งที่ 2 ครบ 14 วัน และหลังพ่นเชื้อ ครั้งที่ 3 ครบ 4 วัน	62
11	ระดับอาการ โรคบนช่อผลองุ่นที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยการประเมินโรคก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต (16 เมษายน 2553)	65
12	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนช่อผลองุ่นที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยการประเมินโรคหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน ในกรณีไม่ทำแผล	67
13	เปอร์เซ็นต์การครอบครองกิ่งองุ่นของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) เมื่อตรวจเชื้อหลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 1(29 พ.ค.53) ถึงครั้งที่ 5 (22 ก.ค.53)	71
14	ระดับอาการ โรคบนช่อผลองุ่นหลังจากพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยประเมินผลก่อนเก็บเกี่ยว	75
15	อิทธิพลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp(Bs) และ เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) ต่อขนาดช่อ ขนาดผล และน้ำหนักของอองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา	78
16	อิทธิพลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) ต่อเปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) และเปอร์เซ็นต์ tritratable acidity (TA) ขององุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคช่อผลองุ่นที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยการประเมินโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน	81

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสขององุ่น	33
2	ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*	34
3	รูปแบบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ (T) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (C) บนอาหาร PDA หลังทดสอบ 10 วัน	39
4	ยีสต์ไอโซเลท Epi 7(1) เจริญลามเข้าไปตามเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA หลังวางเชื้อพร้อมกันเป็นเวลา 5 วัน	40
5	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากใบองุ่นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar หลังจากวางเชื้อพร้อมกัน 5 วัน	43
6	ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบองุ่นในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 7 วัน	46
7	ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่าง ๆ (T) ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น โดยวิธี Dual culture	49
8	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นโดยวิธี spot inoculation	51
9	ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคแอนแทรค-โนสบนผลขององุ่น	58
10	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ในการควบคุมโรคแอนแทรค-โนสบนผลขององุ่น	59

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบองุ่นในกรรมวิธีต่างๆ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	63
12	ลักษณะช่อผลองุ่นในสภาพแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น ระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2553	66
13	ลักษณะอาการของโรคหลังการเก็บเกี่ยว	68
14	ลักษณะผลองุ่นที่ปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* หลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน กรณีทำแผล	69
15	ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์จากกิ่งองุ่นในกรรมวิธีต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	72
16	ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01, PM9) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (BB165, Endo 2(2)) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Epi3(2)) บนใบองุ่นหลังจากพ่นเชื้อครั้งที่ 1 (29 พฤษภาคม 2553) จนถึงครั้งที่ 10 (5 ก.ย. 2553)	73
17	ลักษณะอาการของโรคผลเน่าดำ (Black mold rot; *Aspergillus niger*) และลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus niger*	74
18	ลักษณะช่อผลองุ่นในสภาพแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นหลังการเก็บเกี่ยว ระหว่าง 29 พฤษภาคม - 8 กันยายน 2553	76
19	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบที่ streak บนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	83

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFU	=	จำนวนโคโลนีต่อหนึ่งหน่วย (colony forming unit)
g	=	กรัม (gram)
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
NGA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose agar)
NGB	=	อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose broth)
OD	=	ค่าการดูดกลืนแสง (optical density)
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
%	=	เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น

Efficacy of Antagonistic Microorganisms for the Control of Grape Anthracnose

คำนำ

องุ่นจัดอยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ Vitaceae เป็นผลไม้ที่มีรสชาติดี ราคาแพง มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ นิยมรับประทานผลสด และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ลูกเกด ไวน์ บรั่นดี และขนม เป็นต้น แหล่งปลูกองุ่นที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ อำเภอบ้านแพ้วและอำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน และ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (ชลอ, 2539) องุ่นมีโรครบกวนอยู่ตลอดระยะเวลาของการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่เป็นโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อน มีความชื้นในอากาศสูง ทำให้การระบาดของเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายให้กับสวนองุ่น โรคที่ถือว่าสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส โรคราน้ำค้าง โรคราสนิม โรคราแป้งขาว และโรคผลเน่า เป็นต้น (กลุ่มเกษตรสัญจร, ม.ป.ป.) โรคแอนแทรคโนส นับเป็นโรคทางใบและผลที่สำคัญขององุ่น เกษตรกรผู้ปลูกองุ่นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรคแต่ละรอบการเก็บเกี่ยวเป็นจำนวนไม่ใช่น้อยและอาจถือได้ว่าเป็นต้นทุนการผลิตที่อยู่ในเปอร์เซ็นต์สูง เมื่อเทียบกับต้นทุนการผลิตด้านอื่นๆ การควบคุมโรคดังกล่าวที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบันนิยมพ่นด้วยสารเคมีทั้งประเภทสัมผัสและดูดซึม ทั้งนี้เนื่องจากสารเคมีออกฤทธิ์เร็ว มีประสิทธิภาพ เห็นผลชัดเจน สะดวกในการซื้อ การใช้และการเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมด้วยสารเคมีมักมีผลเสีย กล่าวคือ มีราคาสูง เกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลผลิตและสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างทั้งในผลผลิต และสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะผลองุ่นที่ผู้บริโภครับประทานสด มีโอกาสที่ผู้บริโภคจะได้รับสารพิษเข้าไปในร่างกายได้ง่ายและสะสมจนมีปริมาณมากขึ้น นอกจากนั้นยังส่งผลให้เชื้อราสาเหตุโรคมีโอกาสพัฒนาจนดื้อต่อสารเคมีอีกด้วย

ปัจจุบันได้มีการศึกษา ค้นคว้าวิจัยเพื่อนำเอาจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อคน พืช และสัตว์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชกันมากขึ้น โดยนักวิจัยและนักวิชาการหลายท่านได้ศึกษาค้นคว้า พบว่า เชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp.และ *Bacillus subtilis*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* และ *Colletotrichum* sp. เป็นต้น (จิระเดช, 2549) การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เป็นศัตรูต่อเชื้อโรค นับว่าเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีช่วยลดปัญหาเชื้อโรคดื้อต่อสารเคมี ช่วยเพิ่มผลผลิตซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่สิ้นเปลืองพลังงานและยังช่วยอนุรักษ์สภาพแวดล้อม รักษาสมดุลแห่งธรรมชาติได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติบนผิวใบ ผล และรากพืช ที่มีความสามารถในการยับยั้งเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทดสอบคุณสมบัติในการควบคุมและวิธีการที่จะคงชีวิตของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังจากนำ ไปใช้ในสภาพแปลง ซึ่งการศึกษาเหล่านี้เป็นแนวทางในการพัฒนาการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นโดยชีววิธีเพื่อช่วยลดหรือหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการควบคุม อันเป็นประโยชน์ต่อการผลิตพืชผลให้ปลอดภัยจากสารพิษ และเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Detached fruit

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในสภาพแปลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

องุ่นเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ Vitaceae ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียวที่เป็นผลไม้รับประทานได้ เป็นไม้เลื้อยประเภทยืนต้น มีมือจับเพื่อเกาะยึด มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตกึ่งร้อนถึงร้อน แบ่งเป็น 2 สกุลย่อย (subgenera) คือ *Euvitis* และ *Muscadinia* โดยยึดหลักความแตกต่างกันทางลักษณะสัณฐานและจำนวนโครโมโซม *Euvitis* มีจำนวน 38 โครโมโซม ในขณะที่ *Muscadinia* มีจำนวน 40 โครโมโซม (นันทกร, 2546)

การผลิตองุ่นเพื่อการค้าในประเทศไทยในระยะแรกมีการผลิตในจังหวัดราชบุรี และนครปฐม แต่ในปัจจุบันได้มีการขยายการผลิตไปเกือบทุกภาคและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ องุ่นที่มีการผลิตจำหน่ายเป็นปริมาณมาก ได้แก่ พันธุ์ไวท์มะละกา ผลสีเขียว และพันธุ์คาร์ดินัล ผลสีม่วงดำ ราคาจำหน่ายในท้องตลาดอยู่ที่กิโลกรัมละ 50-80 บาท ในขณะเดียวกันได้มีผู้นำพันธุ์ใหม่ๆ มาจากต่างประเทศ ทั้งองุ่นไม่มีเมล็ดและพันธุ์ที่มีผลโต ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพใกล้เคียงกับองุ่นนำเข้าจากต่างประเทศ มีการควบคุมการใช้สารเคมีจึงทำให้สามารถจำหน่ายได้ในราคาสูง กิโลกรัมละ 200-350 บาท (สุทธ์สินี, 2543)

ในอดีต ประเทศไทยมุ่งใช้ประโยชน์จากองุ่นในด้านการรับประทานสดเพียงอย่างเดียว แต่ปัจจุบันได้นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ มากขึ้น โดยใช้พันธุ์ปลูกเดิมที่มีอยู่ รวมทั้งการนำพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติเฉพาะมาปลูก การใช้ประโยชน์จากองุ่นมีดังนี้

1. องุ่นรับประทานผลสด (Table grape) องุ่นรับประทานผลสดที่รู้จักส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ไวท์มะละกา พันธุ์คาร์ดินัล ซึ่งปลูกได้ผลดี คุณภาพอยู่ในเกณฑ์ดีไม่แพ้องุ่นจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังมีพันธุ์อื่นๆ ที่เคยนำมาปลูกและมีแนวโน้มว่าจะใช้รับประทานสดได้ดี เช่น พันธุ์ลูส-เพอร์เลท เป็นต้น องุ่นที่ใช้รับประทานผลสดควรมีคุณสมบัติ ดังนี้ คือ

1.1 ผลมีรูปร่างสวยงามชวนซื้อ เช่นผลทรงยาว ทรงกลม ขนาดของผลใหญ่ พวกที่มีขนาดเล็กเกินไปจะไม่สะดุดตา ไม่ชวนซื้อ รวมทั้งพวกที่ทรงผลไม่สวย บิดเบี้ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ช่อผลมีรูปร่างสวยงาม ผลยาว และมีจำนวนมาก เช่น ช่อผลทรงกระบอก และมีไหล่ช่อ เป็นต้น นอกจากช่อผลควรจะใหญ่แล้ว ต้องมีลักษณะช่อผลโปร่งๆ คือ ผลไม่แน่นเกินไป หรือผลเบียดเสียดกันมาก แต่ก็ไม่หลวมหรือผลอยู่ห่างกันเกินไป

1.3 รสดี สีสวย หวาน กรอบ ไม่ฝาด ไม่เปรี้ยว เปลือกผลบาง ซึ่งเป็นลักษณะขององุ่นพวกวินิเฟอร่า พวกที่เปลือกเหนียว ต้องคายเปลือกทิ้งไม่เหมาะที่จะเป็นองุ่นรับประทานสด นอกจากนี้ยังมีลักษณะพิเศษอื่นๆ เช่น เมล็ดน้อย เมล็ดลีบ หรือไม่มีเมล็ด มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ส่วนสีนั้นพวกที่มีสีสวยงาม สดใส จะสะดุดตาชวนซื้อมากกว่า

1.4 เก็บไว้ได้นาน ขนส่งได้ดี ไม่ร่วงไม่เน่าเสียง่าย โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องส่งไปไกลๆ หรือส่งไปขายยังต่างประเทศ พันธุ์ที่เก็บไว้ได้นาน ทนทานต่อการขนส่งจะได้เปรียบมากกว่า

2.องุ่นตากแห้ง (Raisin) หรือ ลูกเกด คือ ผลองุ่นที่แก่แล้ว นำมาตากให้น้ำระเหยออกไป กลายเป็นองุ่นแห้งหรืออาจใช้วิธีทำให้แห้งโดยกระบวนการอย่างอื่น เมื่อแห้งแล้วจึงบรรจุลงภาชนะจำหน่ายได้ คุณสมบัติของพันธุ์องุ่นที่ใช้ทำเป็นลูกเกดควรไม่มีเมล็ด และขนาดของผลพอเหมาะ ตากแห้งเร็ว ผลแห้งแล้วมีลักษณะอ่อนนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง ตากแห้งแล้วมีรสและกลิ่นดี ไม่มีกลิ่นหืน หรือกลิ่นที่ไม่ชวนรับประทาน หรือรสจืดชืด และเมื่อตากแห้งแล้วไม่เหนียวเหนอะหนะ

3. องุ่นคั้นน้ำ (Fresh or sweet juice grape) องุ่นคั้นน้ำมี 2 ลักษณะ คือ คั้นแล้วดื่มเลยและแบบคั้นน้ำแล้วบรรจุภาชนะไว้นานๆ เช่น บรรจุกระป๋องปิดผนึก ซึ่งปกติแล้วมักจะไม่แต่งรสหรือแต่งเพียงเล็กน้อย ตามความนิยมของผู้บริโภค องุ่นคั้นน้ำจึงควรเป็นพันธุ์ที่มีรสดี กลิ่นหอม และเมื่อคั้นแล้วไม่เสียรส เสียกลิ่นไป

4. ผลองุ่นในน้ำเชื่อม หรือผลองุ่นบรรจุกระป๋อง (Canning grape) หมายถึงองุ่นที่เป็นผลๆ บรรจุอยู่ในน้ำเชื่อม เช่นเดียวกับผลไม้กระป๋องอย่างอื่น ลักษณะของพันธุ์องุ่นที่ใช้ผลบรรจุกระป๋อง คือ ไม่มีเมล็ด เพราะสะดวกในการรับประทานมากกว่ามีเมล็ด ผลร่วงจากขั้วง่าย หรือปลิดผลง่ายใช้เวลาน้อย เป็นพันธุ์ที่มีสีเขียวอ่อนหรือสีขาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. องุ่นทำเหล้า (Wine-grape) ในหลายๆ ประเทศส่วนใหญ่ปลูกองุ่นเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านทำเป็นเหล้าองุ่นหรือไวน์ ลักษณะพันธุ์ที่ใช้ทำเหล้าได้ดี คือ ให้ผลผลิตดกมาก ปลูกง่าย ดูแลง่าย เป็นพันธุ์ที่หมักแล้วได้รสอร่อย สีสวย เป็นที่นิยมของผู้บริโภค (สุทธ์สินี, 2543)

โรคองุ่นที่สำคัญ (นิพนธ์, 2542)

โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis.) Berl. & De Toni in Sacc.

โรคกิ่งแห้ง (Bitter rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Greeneria uvicola* หรือ *Melanconium fuligineum*

โรคสแคป (Scab, Anthracnose, Bird's eye spot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Elsinoe ampelina* (De Bary) Shear, anamorph-*Sphaceloma ampelinum* De Bary

โรคราสนิม (Rust) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Physopella ampelopsidis* (Diet & Syd.) Cumm. & Amachar หรือ *Phakopsora ampelopsidis* (Diet. Et P. Syd.)

โรคใบจุด, ผลจุดนูนดำ (Leaf spot, Fly speck) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp.

โรคใบไหม้ ใบลวก (pierce' disease) สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (Rickettsia – like bacterium)

โรคราแป้ง (Powdery mildew) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Uncinula necator* (Schevein) & Burrill, anamorph-*Oidium tuckeri* Berk.

โรคใบจีบคล้ายพัด (Fanleaf degeneration) สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Grape Vine Fan Leaf Virus (GFLV)

โรคลำต้นและรากเน่าจากเห็ดรา (Armillaria stem and root rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Kummer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose, Ripe rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.

โรคราสีเทา (Gray mold) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* Pers.

โรคผลเน่า (Black mold rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* Van Tiegh.

โรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot)) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) *Gritfon & Maubl.*

โรคผลเน่านิ่ม (Rhizopus soft rot, Leak) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb ex. Fr.) Lind.

โรคแอนแทรคโนสขององุ่น (Anthracnose, Ripe rot)

โรคแอนแทรคโนสขององุ่นมีรายงานครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาใน ปี ค.ศ. 1891 (Southworth, 1891) สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. และมีรายงานว่าเชื้อรา *C.acutatum* ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในประเทศสหรัฐอเมริกา (Daykin and Milholland, 1984) ญี่ปุ่น (Yamamoto *et al.,* 1999) และออสเตรเลีย (Melksham *et al*., 2002) รวมทั้งมีรายงานว่าเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผลและพริก (Kim *et al*., 2007; Kim and Hong, 2008; Kim *et al*., 2008) ในประเทศไทยโรคแอนแทรคโนสทำความเสียหายให้กับชาวสวนองุ่นมาก รองลงมาจากโรคราน้ำค้าง ชาวบ้านมักเรียกโรคนี้ว่าโรคอีบุบ หรือ โรคลูกบุบเพราะอาการที่เกิดกับผลนั้นจะเป็นแผลลึกลงไปในเนื้อ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* โรคนี้ทำความเสียหายกับทุกส่วนขององุ่นโดยเฉพาะส่วนที่ยังอ่อนอยู่ เช่น ยอดอ่อน กิ่งอ่อน ใบอ่อน ส่วนผลก็เป็นโรคได้ทั้งในระยะผลอ่อนจนถึงระยะผลโต ระบาดมากในช่วงอากาศชื้น โดยเชื้อโรคสามารถแพร่ระบาดไปกับลมและน้ำ พันธุ์องุ่นที่เสียหายจากโรคแอนแทรคโนสมากคือพันธุ์คาดินัลและไวท์มะละกา

ลักษณะอาการบนใบ ส่วนใหญ่เป็นกับใบอ่อนที่เพิ่งแตกใหม่ เห็นเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาล ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น รูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม ถ้าอากาศแห้งเนื้อเยื่อจะหลุดไป ทำให้ใบเป็นรู ถ้าเป็นที่เส้นกลางใบจะเห็นใบม้วนงอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทางด้านล่าง แผลสีน้ำตาลเข้มและบุ๋มลึกลงไป แผลเป็นรูปไข่และขยายตามความยาวของก้านใบ ใบที่เป็นโรคไม่เติบโตต่อไป ถ้าเป็นมากๆ ใบมักจะร่วงเหลือแต่เถาเท่านั้น

ลักษณะอาการบนยอดอ่อน เริ่มจากเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลเข้มต่อมาขอบแผลขยายออกตามความยาวของกิ่ง มีลักษณะหัวแหลมท้ายแหลม ขอบแผลเป็นสีน้ำตาลแก่ถึงดำ กลางแผลสีดำขรุขระ ในช่วงฤดูฝนที่อากาศมีความชื้นสูงจะเห็นเป็นจุดเล็กๆ สีชมพูตรงกลางแผล ถ้าเป็นแผลมากๆ ยอดจะแคระแกร็น มีการแตกยอดมาก แต่ยอดที่แตกออกมาแล้วแคระแกร็นไม่เติบโตต่อไป ใบที่แตกใหม่มีขนาดเล็กและสีซีดผิดปกติ ในที่สุดกิ่งนั้นก็จะตายไป

ลักษณะอาการบนช่อดอก มักจะเกิดตรงก้านของช่อดอก ระยะแรกจะเห็นเป็นเงาสีน้ำตาลที่ก้าน ถ้าตัดก้านดูจะพบเนื้อเยื่อภายในถูกทำลายเป็นโพรงเล็กๆ ต่อมาแผลจะยุบลงเป็นรอยบุ๋ม ในที่สุดช่อดอกจะแห้ง ถ้าเกิดโรคนี้ที่ก้านช่อในระยะติดผลจะทำให้ผลเหี่ยวหมดทั้งช่อ

ลักษณะอาการบนผล โรคนี้สามารถเป็นได้กับผลทุกระยะตั้งแต่เล็กจนโต ในผลอ่อนที่เป็นโรคจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้มและบุ๋มลงไปเล็กน้อย ขอบแผลมีสีเข้ม ถ้าอากาศชื้น จะเห็นจุดสีชมพูถึงสีส้มตรงกลางแผล ถ้าผ่าผลดูจะเห็นเนื้อขององุ่นถูกทำลายจนเนื้อยุบ ส่วนในผลแก่ที่ผลองุ่นเริ่มเข้าสีจะเห็นบริเวณที่เน่าเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีชมพู สีส้ม เกิดขึ้นตรงกลางแผล ถ้าโรคยังคงเป็นต่อไปจะทำให้แผลแห้ง เปลือกเหี่ยว ผลติดกับช่อไม่ร่วงหล่น เมื่อโดนน้ำหรือน้ำค้างเชื้อโรคก็จะแพร่ไปยังผลอื่นภายในช่อ จนกระทั่งผลเน่าเสียหมดทั้งช่อ (ยงยุทธ, 2547)

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสโดยการใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้แก่ สารเคมีประเภทไม่ดูดซึม เช่น zineb, maneb, captan และสารประกอบทองแดง โดยใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน ส่วนสารเคมีประเภทดูดซึมเช่น carbendazim, benomyl, prochloraz นิพนธ์ (2542) กล่าวว่าสามารถป้องกันกำจัดโรคแอน-แทรคโนสขององุ่นได้ โดยการควบคุมโรคในสวนระยะก่อนเก็บเกี่ยวด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดเดียวกับการควบคุมระยะหลังการเก็บเกี่ยว ด้วยสาร carbendazim หรือ รมด้วยก๊าซซัลเฟอร์-ไดออกไซด์

Santos *et al*., (2002) รายงานว่าการใช้สารเคมี propiconazole, bitertanole, imazalil และ hexaconazole ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมี propiconazole สามารถลดการเกิดโรคในสภาพเรือนทดลองได้ 32-54 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบในระดับแปลง การนำท่อนพันธุ์ของสตรอเบอรี่ไปจุ่มในสารเคมี carbendazim, bitertanol และ thiabendazole สามารถลดการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ การใช้สารกำจัดเชื้อรา pyraclostrobin (Cabrio) ร่วมกับ ethylenebisdithiocarbamate (Manex) หรือ Chlorothalonil (Bravo Ultrex) อย่างเดียว หรือใช้ Manex ร่วมกับ copper hydroxide หรือการใช้ pyraclostrobin กับ boscolid ช่วยลดการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสของ bell pepper ที่เกิดจากเชื้อรา *C. acutatum* ในผลพริกที่แก่เต็มที่ นอกจากนี้การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่ม strobilurin ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับ maneb หรือ acibenzolar-s-methyl สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ (Lewis *et al*., 2004)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การทำการเกษตรที่ผ่านมาเกษตรกรมุ่งใช้เทคโนโลยีทางด้านสารเคมีมาโดยตลอด ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อโรคพืชเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะสารฆ่าเชื้อรา ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มนุษย์และสัตว์ สารเคมีเป็นพิษตกค้างในสภาวะแวดล้อม ผลิตผลเกษตรและมีผลกระทบต่อผู้บริโภค สมคิด (2540) กล่าวว่าการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างขาดความระมัดระวัง นอกจากจะเป็นปัญหาโดยตรงต่อผู้ใช้แล้วยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นปัญหาของสังคมโดยส่วนรวม ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นใช้วิธีที่เหมาะสมนำมาผสมผสานกันเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพและผลตอบแทนสูงสุดโดยไม่กระทบกระเทือนต่อสิ่งแวดล้อม และสังคมสามารถนำไปปฏิบัติได้ ซึ่งเรียกว่าการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management, IPM) การเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นกรรมวิธีหนึ่งของหลักการ IPM การศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เริ่มต้นเมื่อกลางปี ค.ศ. 1920 เมื่อมีการค้นพบว่าปัญหาโรคพืชสามารถลดความรุนแรงลงได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์ใส่ลงในดินปลูกโดยมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยอาศัยธรรมชาติจัดการกันเอง ต่อมาอีก 20-25 ปี จึงเริ่มมีการศึกษาวิธีใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชและไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช โดยมีผู้ให้ความสนใจและศึกษาเพิ่มมากขึ้น (Baker, 1987 ; Cook, 1991; สมคิด, 2540 ; พรพรรณ, 2550) เนื่องจากตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีปราบศัตรูพืชที่ใช้กันมากขึ้น และปัญหาโรคที่ไม่สามารถควบคุมได้โดยสิ้นเชิงหรือควบคุมได้เพียงบางส่วน ตัวอย่างเช่น โรคปุ่มปม (crown gall) บนพืชหลายชนิดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Agrobacterium* sp. ยังไม่สามารถป้องกันกำจัดด้วยวิธีการใด ๆ ที่คุ้มทุนเท่ากับการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี ด้วยการใช้ *Agrobacterium radiobacter* strain K-84

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คือ การลดปริมาณและกิจกรรมที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อโรค โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ยกเว้นมนุษย์ (จิระเดช, 2549)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นแนวทางหนึ่งโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อสาเหตุโรคได้ดี มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเพื่อครอบครองพื้นที่ผิว การสร้างสารปฏิชีวนะมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ และการส่งเสริมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาตินั้น (resident antagonist) ให้เพิ่มปริมาณและเกิดกิจกรรมการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ (Tronsmo, 1992) การป้องกันพื้นผิวส่วนต่างๆ ของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเข้าทำลายบริเวณพื้นผิวใบ และดอกของพืชโดยชีววิธี ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้จะเรียกว่า phylloplane หรือ phyllosphere (Dickenson and Preece, 1976; Andrews, 1992) วิธีการนี้ต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญและสามารถแข่งขันการใช้อาหารบนผิวใบหรือดอกของพืชได้ดี สภาพแวดล้อมเข้ามามีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ฯลฯ การดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์มีทั้งที่เป็นแบบ epiphytes และ endophytes (Andrews, 1992) การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพจากส่วนของผิวพืชที่มีในสภาพธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีควรจะมีชีวิตอยู่รอดได้ดีบนผิวพืชในสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับเชื้อสาเหตุโรค โดยสามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ดี สร้างเซลล์หรือสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการรายงานการศึกษา พบว่ามีทั้งที่เป็นเชื้อรา ยีสต์ และเชื้อแบคทีเรีย ในปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้มีการพัฒนารูปแบบเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงการค้า biofungicide เพื่อใช้ควบคุมโรคพืชได้นานตลอดฤดูกาลปลูกพืช (Knudsen and Spurr, 1985 ; Tronsmo, 1992)

1. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช

เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถควบคุม ยับยั้งการเจริญและเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน เช่น *Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Pythium* spp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าและเน่าระดับดิน เชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า เชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด เชื้อรา *Macrophomina phasolina* สาเหตุโรคเมล็ดเน่าของพืชตระกูลถั่ว เชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่ (จิระเดช และวรรณวิไล, 2542) โดยเชื้อรา *T. harzianum* มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อราสาเหตุโรคพืช หลายกลไกดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช (Competition)

เชื้อรา *T. harzianum* เป็นผู้แข่งขันที่ดีในด้านการครอบครองพื้นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร เนื่องจากเชื้อรา *T. harzianum* สร้างเส้นใยได้รวดเร็ว และสามารถสร้างสปอร์ในปริมาณสูง โดยอาศัยอาหารจากเศษวัสดุอินทรีย์ต่าง ๆ Sivan and Chet (1989) แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพืชที่คลุกด้วยสปอร์ของ เชื้อรา *T. harzianum* เมื่อปลูกในดินที่มีความชื้นสม่ำเสมอ ช่วยให้เชื้อรา *T. harzianum* สามารถเข้าครอบครองรอบๆ ราก (rhizosphere) ได้ดี ในขณะที่เชื้อรา *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวมีปริมาณลดลง

1.2 การเป็นปรสิตกับเชื้อโรค (Mycoparasitism)

Elad *et al.* (1983) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* พันรัดเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พร้อมทั้งผลิตเอนไซม์ β-(1, 3) -glucanase และ chitinase ออกมาย่อยสลายผนังของเส้นใย และผนังของเม็ดสเคลอโรเทียม ทำให้เส้นใยของ *T. harzianum* เจริญเข้าไปในเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ได้โดยตรง การทำลายเม็ดสเคลอโรเทียมเกิดขึ้นโดยเส้นใยเชื้อรา *T. harzianum* แทงผ่านเนื้อเยื่อชั้น rind และ ชั้น cortex เข้าไปสลายชั้น medullar แล้วสร้าง chlamydospore อยู่ภายใน และสร้าง conidia อยู่ภายนอกเม็ดสเคลอโรเทียม (Henis *et al*., 1983) เชื้อรา *T. harzianum* เป็นปรสิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Pythium* spp., *Phythophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotina* sp., *Macrophomina* sp., *Cylindocladium* sp., *Verticillium* sp., *Thielaviopsis* sp., *Botrytis cinerea*, *Botryodiplodia* sp. และ *Phomopsis asparagi* (จิระเดช, 2549; Elad, 2000)

1.3 การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis)

ปฏิชีวนสารเป็นผลิตผลที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือต่อต้านการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ โดย Eveleigh (1985) รายงานว่าสารที่เชื้อรา *T. harzianum* สร้างขึ้นมามี 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 trichothecens ได้แก่ trichodermin, 2,3-epoxytrichodermin มีฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ในเชื้อสาเหตุโรคพืช และยังมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชด้วย มีการผลิตสาร trichodermin ขึ้นมาในรูปการค้าชื่อ Suzukacillin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 2 cyclic peptides ได้แก่ alamithicine (antibiotic U-22324) trichotoxin, trichopolynyl และ trichorzianine สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งที่เป็น prokaryotes และ eukaryotes โดยไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกสลาย

กลุ่มที่ 3 isocyanide ได้แก่ trichoridin สารกลุ่มนี้เกิดขึ้นได้ในบางสภาวะ มีฤทธิ์ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับเชื้อนี้เข้าไปจากการกินอาหาร แต่พบได้น้อยมาก (อนุเทพ, 2536 ; ชมพูนุท, 2550)

1.4 การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (Induced resistance)

เชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ ซึ่งแสดงให้เห็นจากการใส่เชื้อรา *T. harzianum* (T-39) บริเวณรากของต้นถั่ว สามารถชักนำให้โรคบนใบถั่วที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *C. lindemuthianum* ลดลงได้ และตรวจไม่พบเชื้อรา *T. harzianum* (T-39) บนใบ นอกจากถั่วแล้วยังพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำความต้านทานได้ทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Harman *et al*., 2004)

2. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค 4 ลักษณะ (นิพนธ์, 2546) ดังนี้

2.1 การแข่งขันกับเชื้อโรค (Competition)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น สำหรับการแข่งขันที่พบมากคือการที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืช เช่น การที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* ผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก (Iron, Fe^{+3}) จึงทำให้เชื้อแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิปักษ์ *P. fluorescens* สามารถใช้ธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถเข้าทำลายรากของข้าวสาลีได้ ส่งผลให้ข้าวสาลีเจริญเติบโต และมีผลผลิตดีขึ้น ซึ่งนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะนี้ว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียนี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizospere) (Schippers *et al*., 1987)

2.2 การผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiosis)

เชื้อแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายมากที่สุด เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเอามาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่นำมาใช้โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นี้สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่นำมาผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน นอกจากนี้กลไกนี้ยังเป็นกลไกแรกที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี นั่นคือการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ซึ่งผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืช ช่วยป้องกันการเกิดโรคกับต้นพืชได้ (Thomson, 1987; Penyalver *et al*., 2000) หรือในกรณีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylate ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรค Take-all ของข้าวสาลีได้ถึง 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Cook, 1993)

2.3 การเป็นปรสิต (Parasitism)

เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) สามารถเข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นปัจจุบันพบไม่มากนัก และการใช้เพื่อควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่ยังมีรายงานการเป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia urediniolytics* ที่เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม (rust) เชื้อแบคทีเรีย *Bdellovibrio bacteriovorus* ที่เป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *glycinnea* สาเหตุโรคใบไหม้ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *B. penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจังจึงนับว่าเป็นส่วนหนึ่งที่น่าศึกษาพัฒนานำมาใช้ในการควบคุมโรคต่อไป

2.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance)

เป็นกลไกที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค เมื่อนำมาทำให้สูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชตระกูลแตง (cucurbit) จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช และช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine แล้วปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

3. **การใช้เชื้อยีสต์ในการควบคุมโรคพืช**

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคารีโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี นอกจากนี้ อาจจะมีรูปร่างคล้ายรูปถั่ว เลมอน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะของยีสต์เป็นเซลล์เดียวและมีหน่อ บางครั้งการแตกหน่อไม่ทำให้เซลล์หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียกซูโดไมซีเลียม (Pseudomycelium) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างไมซีเลียมจริง (true mycelium) โดยไมซีเลียมจริงนี้มีผนังกั้นตามขวางแบ่งเป็นเซลล์ๆ มีหน่ออยู่ที่รอยกั้นตามขวาง (วิลาวัณย์, 2539) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับยีสต์ คือ 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์เจริญได้คือ 35-47 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่ยีสต์เจริญได้คือ 0 องศาเซลเซียส ยีสต์ชอบ pH ที่เป็นด่าง แต่ที่ pH 4-4.5 ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ (มัทนา, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช พบว่าสามารถควบคุมโรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวได้โดยเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* strain A42 และ *Acremonium cephalosporium* stain B11 สามารถควบคุมโรคเน่าในองุ่น ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Rhizopus stolonifer* ได้ (Zahavi *et al*., 2000) เชื้อยีสต์ *Pichia anomala C. sake* และ *Rhodotorula glutinis* ยังสามารถควบคุมโรค blue mold และ gray mold ทั้งในแอปเปิ้ลและสาลี่ เชื้อยีสต์ *C. oliophila* ใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ทางการค้าคือ Aspire™ สามารถควบคุมโรค blue mold และ gray mold ในส้มและ pome fruit (Zhou *et al*., 2001) เชื้อยีสต์ *C. ciferrii* strain 283 สามารถลดโรค blue mold ของ แอปเปิ้ล ได้ถึง 80 % ที่ 25 องศาเซลเซียส (Vero *et al*., 2002) Saligkarias และคณะ (2002 a) รายงานว่าเชื้อยีสต์หลายชนิดได้แก่เชื้อยีสต์ *Galactomyces geotrichum Trichosporon pullulans Aureobasidium pullulans C. pulcherrina C. sake C. guilliermondii* strains 101 และ US 7 และ *C. olephila* strain I-182 สามารถควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในมะเขือเทศได้

เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว สามารถใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียวหรือนำยีสต์มาใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆในการควบคุมโรค เช่น การใช้ร่วมกับสารเคมี การใช้ร่วมกับรังสี UV เป็นต้น การนำยีสต์มาใช้ร่วมกับวิธีการควบคุมแบบอื่นทำให้ยีสต์สามารถควบคุมโรคได้ดีขึ้น และส่งเสริมให้ยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยยีสต์มีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค 3 ลักษณะ ดังนี้

3.1 กลไกการควบคุมแบบแข่งขันการใช้อาหาร

Vero และคณะ (2002) รายงานว่าพบการแย่งอาหารระหว่างเชื้อยีสต์ *Crytococcus laurentii* strain 317 และ *Candida ciferrii* strain 283 กับเชื้อรา *Penicillium expansum* สาเหตุโรค blue mold และ เชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* ก็สามารถควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรค green mold ในส้มได้เช่นกัน (Saligkarias *et al*., 2002 b)

3.2 การผลิตสารอินทรีย์จากเชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์ *C. guillierondii* สายพันธุ์ US 7 มีการสร้างเอนไซม์มาย่อยผนังเซลล์ในกลุ่ม β-1,3-glucanases ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* โดยพบเส้นใยของเชื้อราเป็นรูและมีการยุบตัวภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ scanning และtransmission แสดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้เห็นถึงการผลิต extracellular polymers ที่เพิ่มเข้ามารอบๆเซลล์ของเชื้อยีสต์ (Saligkarias *et al*., 2002 b) และกลไกนี้ยังพบในเชื้อยีสต์ *Pichia guilliermondii* isolate 87 ที่มีต่อเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *P. expansum* บนผลแอปเปิ้ล (Wisniewski *et al.*, 1991) การผลิต extracellular fatty acids ของเชื้อยีสต์ *Pseudozyma* sp. มีพิษต่อเชื้อราในกลุ่ม powdery mildew โดย fatty acid ส่งผลให้ cell membrane ของเชื้อราไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติและเกิดการแยกส่วนของเซลล์ขึ้น (Avis and Belanger, 2002) การผลิต toxic metabolites ของเชื้อยีสต์ *Metschnikowia pulcherrima* 4 isolates (GS37,GS88,GA102 และBIO126) สามารถใช้ควบคุมเชื้อรา *B. cinerea P. expansum Alternaria* sp.และ *Monilia* sp. บนผล แอปเปิ้ล (Spadaro *et al*., 2002)

3.3 การชักนำความต้านทานในเนื้อเยื่อพืช

การชักนำความต้านทานในเนื้อเยื่อพืช เช่น การผลิตก๊าซเอทธิลีนในเนื้อเยื่อต้นพืชที่ใส่ยีสต์ *C. guilliermondii* สายพันธุ์ US 7 (Saligkarias *et al*., 2002 b) หรือการใส่เชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* ในส้ม พบว่าเชื้อยีสต์กระตุ้นการสร้างเอทธิลีน และมีการเพิ่มระดับเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งมีความสัมพันธ์ในกลไกการป้องกันตัวเอง (Barkai-Golan, 2001)

จากรายงานของ Jacometti และคณะ (2010) ได้มีการรวบรวมข้อมูลการใช้จุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตในรูปแบบการค้าที่มีการใช้เพื่อควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในองุ่นซึ่งเป็นทางเลือกของการควบคุมโรคพืชใน ตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ชนิดของจุลินทรีย์ ชื่อทางการค้า และการอ้างอิงถึงกลไกของจุลินทรีย์ของ biofungicide ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในองุ่น

ชนิดของจุลินทรีย์	ชื่อการค้า	กลไกของจุลินทรีย์
Filamentous fungi and oomycetes		
Ampelomyces quisqualis	AQ10 (Vidhyasekaran, 2004)	Parasitism (Morando *et al*., 2000)
Gliocladium catenulatum	PrimaStop, PreStop (Vidhyasekaran, 2004)	Antibiosis (Machowicz-Stefaniak, 1998)
Pythium oligandrum	Polygandron (Mohamed *et al*., 2007 ;Vidhyasekaran, 2004)	Parasitism, induces host defences (Vidhyasekaran, 2004)
Trichoderma atroviride	Sentinel*‡ (Young, 2008)	Competitive exclusion (Young, 2008)
Trichoderma harzianum	Harzian 10, Harzian 20, F-stop, Plantsheild, Rootshield, Supraavit, T2,T-22G,T-22B,T-35, Topshield, Trichodermin, Trichodex (Elad, 2000; Harman *et al*.,1996 ; Utkhede and Mathur 2002; Vidhyasekaran, 2004)	Competitive exclusion , antibiosis, enzyme interruption, induces host defences (Vidhyasekaran, 2004)
Trichoderma harzianum and *Trichoderma polysporum*	Binab (Vidhyasekaran, 2004)	Competitive exclusion , antibiosis, enzyme interruption, induces host defences (Vidhyasekaran, 2004)
Trichoderma harzianum and *Trichoderma viride*	Trichodowels, Trichoject, Trichopel, Trichoseal (Calderon *et al*., 1993; Vidhyasekaran, 2004)	Competitive exclusion , antibiosis, enzyme interruption, induces host defences (Vidhyasekaran, 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ชื่อการค้า	กลไกของจุลินทรีย์
Trichoderma virens	GlioGard and SoilGard (Harman *et al*., 1996; Vidhyasekaran, 2004)	Mycoparasite (Baek *et al*.,1999), induces host defences (Howell *et al*., 2000)
Ulocladium oudemansi	Botry-Zen*§(Young, 2008)	Competitive exclusion (Young, 2008)
Yeasts		
Candida oleophila	Aspire (Saligkarias *et al*., 2002)	Competitive exclusion (Mercier and Wilson ,1994)
Candida saitoana	Bio-Coat†, Biocure† (Schena *et al*.,2004) in (Elmer and Reglinski, 2006)	Parasitism, antibiosis and induces host defences (Ahmed *et al*., 1998)
Cryptococcus albidus	Yeild Plus (Helbig, 2002)	Parasitism (Elad, 1996)
Metschnikowia fructicola	Shemer† (Karabulut et al., 2004; Kurtzman and Droby ,2001)	Competitive exclusion (Blachinsky *et al*., 2007; Kurtzman and Droby, 2001)
Saccharomyces chevalieri	Saccharopulvin (Sesan *et al*. 1999)	
Bacteria		
Bacillus subtilis	Bactophyt, Epic (BM 1600), Kodiak, Serenade Max*¶, System 3 (GB03) (Vidhyasekaran, 2004 ; Young, 2008)	Antagonism, prevents spore germination, germ tube elongation and germ tube penetration. (Vidhyasekaran, 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ชื่อการค้า	กลไกของจุลินทรีย์
Pseudomonas fluorescens	BioCoat, Conqueror (Trotel-Aziz *et al*.,2008 ; Vidhyasekaran, 2004)	Induces host defences, antibiosis (Vidhyasekaran, 2004)
Pseudomonas syringae	Bio-save (Elmer and Reglinski ,2006 ; Long *et al.*, 2005)	Induces host defences, antibiosis (Elad and Stewart, 2004)
Streptomyces griseoviridis	Mycostop (Vidhyasekaran, 2004; White *et al.*,1990)	Parasitism (Tapio and Pohtolahdenpera, 1991)

หมายเหตุ * ขึ้นทะเบียนเพื่อใช้กับเชื้อรา *B. cinerea* ในองุ่นในประเทศ นิวซีแลนด์
† ใช้หลังการเก็บเกี่ยว
‡ ใช้ระยะออกดอก ก่อนปิดช่อ ระยะการเปลี่ยนสีผล (verasion) และ ก่อนเก็บเกี่ยว
§ ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นจนและจุดถึงระยะที่เจริญเต็มที่ ที่ระยะผลอ่อนและระยะปิดช่อ
¶ ใช้ทุก 7 -10 วัน ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงเก็บเกี่ยวผลผลิต และไม่พ่นในระยะออกดอก
ที่มา : Jacometti *et al.*(2010)

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสโดยชีววิธี

Koomen and Jeffries (1993) แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จากช่อดอก ใบ และผลของมะม่วงทั้งหมด 648 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และ filamentous fungi พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท 204 จำแนกได้เป็น *Bacillus cereus* และ ไอโซเลท 558 จำแนกได้เป็น *Pseudomonas fluorescens* สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของ conidia ของ *C. gloeosporioides* และการพัฒนาของแผลแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงได้

Sariah (1994) ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ รวมทั้งทำให้เส้นใยมีรูปร่างผิดปกติไป โดยเส้นใยหนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขึ้นและมีช่องว่างเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ และพบว่าเมื่อพ่นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทำให้ลดการเข้าทำลายและลดจำนวนแผลที่เกิดขึ้นได้

Stiriling *et.al.* (1995) ได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณผิวใบ ดอก และผลของอโวกาโด เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียและยีสต์ที่ให้ผลในการยับยั้งขนาดแผลได้ดีที่สุดคือ *Bacillus* spp. และ *Aureubasidium* spp. ตามลำดับ

ถิรัตถ์ (2545) รายงานว่าการใช้ชีวผลิตภัณฑ์คีโตเมี่ยมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคปาล์มได้สูงสุด 54.24 และ 72.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิไลรัตน์ (2546) ศึกษาการใช้เชื้อราเพื่อควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสขององุ่น โดยพบว่า *Trichoderma harzianum* PC 01 สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีสุดในห้องปฏิบัติการ รองลงมา คือ *Pencillium chrysogenum* PC, *T. hamatum* PC07, *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของชีวผลิตภัณฑ์เชื้อ คีโตเมี่ยม โตรโคเดอร์มา เพนนิซิเลี่ยม มิ๊กเจอร์ (คีโตเมี่ยม +โตรโคเดอร์มา + เพนนิซิเลี่ยม) ชนิดผง และการทดลองเปรียบเทียบ เบนโนมิลและไดฟีโนโคนาโซลและสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ได้แก่ เมทธามิโดฟอส และเมทโธมิล ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น 5 สายพันธุ์ เป็นเวลา 1 ปี พบว่า ชีวผลิตภัณฑ์เชื้อชนิดผงคีโตเมี่ยม ไตรโคเดอร์มา เพนนิซิ-เลี่ยม มิ๊กเจอร์สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่ใบ กิ่ง และผลองุ่นพันธุ์บิ๊กแบล็ค น่านฟ้า แบล็คโอปอล์ ลูสเพอร์เลท และไวท์มะละกา ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ วิธีการใช้ชีว-ผลิตภัณฑ์หรือเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคลดลงอยู่ในช่วง 14.00-56.00 เปอร์เซ็นต์

อรุณ (2551) คัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. capsici* ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในผลไม้และผักไทยจำนวน 11 ชนิด พบยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการเจริญของเชื้อราจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ R13 R16 ER1 และ L2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ 93.3 เปอร์เซ็นต์ 83.1 เปอร์เซ็นต์ 76.6 เปอร์เซ็นต์ และ 66.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยบ่งชี้ชนิดของยีสต์ คือ *Pichia guilliermondii Candida musae Issatchenkia orientalis* และ *C. quercitrusa* ตามลำดับโดยที่ *P. guilliermondii* สายพันธุ์ R13 สามารถลดโรคบนผลพริกเหลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ายีสต์มีกลไกในการแย่งอาหารกับเชื้อรา *C. capsici*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Autoclave/Hot air oven
2. Petri dishes
3.Tubes
4. Pipette/Tips
5. Haemacytometer
6. Depression slide
7. ตะกร้าพลาสติก
8. กล่องพลาสติก
9. Foggy
10. สารเคมีควบคุมเชื้อรา
11. Compound microscope
12. Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร
13. Spectrophotometer/Cuvett
14. Streptomycin
15. Rifampicin
16. 3% KOH
17. Shaker
18. กล้องถ่ายรูป
19. ถังพ่นสารเคมี ขนาด 5 ลิตร
20. vernier calipers
21.Hand Refractrometer
22.เครื่องแก้วที่ใช้ในการไตเตรทสาร
23.เครื่อง Microflex MALDI-TOF และโปรแกรม MALDI-Biotyper

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในองุ่น และการพิสูจน์โรค

1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในองุ่น

เก็บตัวอย่างใบและผลขององุ่นที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยแช่ชิ้นส่วนใน 0.525% sodium hypochlorite (chlorox 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อมีเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช นำเส้นใยเชื้อราที่ แยกได้ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคต่อไป

1.2 การปลูกเชื้อเพื่อพิสูจน์โรค

นำ เชื้อราสาเหตุที่แยกได้จากวิธี 1.1 เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางบนใบและผลขององุ่นปกติที่ไม่แสดงอาการโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการพ่นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนปลูกเชื้อ ทำแผลด้วยเข็มบนใบ 2 จุดต่อแผล และไม่ทำแผลบนผลองุ่น จากนั้นนำใบและผลองุ่นที่ปลูกเชื้อแล้วไปบ่มในกล่องพลาสติกชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นวุ้นที่วางไว้ออก บ่มเชื้อต่อเป็นเวลา 5 วัน สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนใบและผลขององุ่น แยกเชื้อราสาเหตุซ้ำอีกครั้ง ตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บลงบนอาหารเอียง PDA เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบองุ่น

เก็บใบองุ่นจากแปลงทดลองใน อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 7 พันธุ์ ได้แก่ Flame Seedless, Superior Seedless, Crimson Seedless, Red-G-SK Seedless, Loose Perlette Seedless, Opal Seedless และ Emerald Seedless นำใบองุ่นที่ได้มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ โดยแบ่งเป็น 3 วิธี ได้แก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 การใช้เทคนิคพิมพ์ใบอ่อนที่เป็นโรค (Diseased leaf printing technique)โดยกดใบอ่อนที่เป็นโรคลงบนผิวอาหาร PDA และ NGA โดยตรง

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์บนผิวใบอ่อน (epiphyte) โดยตัดใบอ่อนปกติที่ไม่ปรากฏอาการโรคใดๆ เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ใส่ใน flask ที่บรรจุน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าด้วย vortex ให้จุลินทรีย์จากผิวใบหลุดออกมาในน้ำ จากนั้นดูดน้ำที่ได้จากการล้างชิ้นใบ 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดและเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร PDA และ nutrient glucose agar (NGA)

2.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในใบอ่อน (endophyte) โดยตัดใบอ่อนขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วย 0.525% sodium hypochlorite (chlorox 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปวางบนอาหาร PDA

เลี้ยงจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบอ่อนด้วยวิธีการต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ ก่อนเลี้ยงในหลอดอาหารเอียง โดยเชื้อราและยีสต์เลี้ยงบนอาหาร PDA ส่วนแบคทีเรียเลี้ยงบนอาหาร NGA แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบพืชในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

3.1 การยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อราที่แยกได้จากใบอ่อนในทุกกรรมวิธี มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ด้วยวิธี Dual culture โดยเลี้ยงเชื้อราทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PDA 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราทดสอบและเชื้อราสาเหตุโรคมาวางพร้อมกันบนอาหาร PDA ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin 100 ppm โดยให้มีระยะห่างกันประมาณ 6 เซนติเมตร ทำทั้งหมด 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี บันทึกผลการทดลองโดยวัดการเจริญของเชื้อราทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เตรียมเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียแขวนลอยทดสอบ โดยวิธี paper disc method โดยนำเชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่แยกให้บริสุทธิ์ และเก็บในหลอดอาหารเอียงมาไอโซเลทละ 1 หลอด เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร กวาดเซลล์ที่เจริญอยู่ในหลอดอาหารเอียงให้ออกมาผสมกับน้ำ เทเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบที่ได้ใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยทดสอบให้ชิ้นกระดาษกรองดูดซับจนชุ่ม ซับเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยส่วนเกินก่อนนำชิ้นกระดาษกรองที่ชุบเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยแล้วมาวางบนอาหาร PDA ที่วางชิ้นวุ้นของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไว้กลางจานเลี้ยงเชื้อแล้ว โดยวางชิ้นกระดาษกรองตรงข้ามกันในแนวกากบาท ห่างจากชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคจุดละ 3 เซนติเมตร ทำทั้งหมด 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี บันทึกผลโดยวัดการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม หลังวางเชื้อทดสอบไปแล้ว 3 วัน คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยตามสูตรข้างต้น และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อทดสอบหลังเสร็จสิ้นการทดลอง

3.2 การยับยั้งการเกิดโรคบนผลองุ่น

ทำการทดสอบกับองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยนำผลองุ่นมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำผสมสารลดแรงตึงผิวหลาย ๆ ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นแบ่งผลองุ่นออกเป็นผลเดี่ยว และช่อย่อยละ 2-3 ผล วางบนตะแกรงในกล่องพลาสติกที่เติมน้ำเพื่อให้ความชื้น แล้วทำแผลบนผิวองุ่นโดยใช้เข็มหมุด 3 อัน ยึดรวมกัน ปลายเข็มห่างกัน 2 มิลลิเมตร แทงลงบนผิวผลให้ลึก ประมาณ 1 มิลลิเมตร กรรมวิธีละ 10 ผล

นำเชื้อราทดสอบที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7-10 วัน เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงในจาน กวาดสปอร์บนผิวหน้าอาหารแล้วปรับให้มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อแผล บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อแผล บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน

เชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ เลี้ยงบนอาหาร NGA และ PDA ตามลำดับเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เติมน้ำเล็กน้อยลงไปบนผิวหน้าอาหาร กวาดเซลล์ของแบคทีเรียมาเจือจางด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 0.2 (OD_{600}= 0.2) ส่วนเชื้อยีสต์ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเช่นกันโดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้ haemacytometer

หยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย หรือยีสต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนผิวผลองุ่นที่ทำแผลไว้แล้ว บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จึงหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรเท่ากันลงไป บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน

ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตการพัฒนาของแผล บันทึกผลเป็นขนาดพื้นที่แผล และนำมาคำนวณหาอัตราการยับยั้งการเกิดโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด

4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้จากใบองุ่นและที่มีอยู่เดิม

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากใบองุ่น ซึ่งได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง และ ผศ.ดร. วรรณวิไล อินทนู ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, สายพันธุ์ T-50, สายพันธุ์ M23, สายพันธุ์ PM 9 และสายพันธุ์ 01-52 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ BB 165 และ สายพันธุ์ DGg 13

5. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น

5.1 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture

นำเชื้อจุลินทรีย์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น บนอาหาร PDA โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแอน-แทรคโนส อายุ 5-7 วัน บนอาหาร PDA ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อรา เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงย้ายเชื้อทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว แตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส วางอยู่ตรงกลาง (spot inoculation) โดยแตะ 4 จุดตรงข้ามกันในแนวกากบาท ส่วนเชื้อยีสต์ทำวิธีการเดียวกับแบคทีเรีย โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract Agar (YMA) อายุ 3 วัน ก่อนนำมาทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์นั้น นำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมาวางไว้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1.5 เซนติเมตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำเชื้อราปฏิปักษ์มาวางไว้ตรงข้ามกับเชื้อราสาเหตุโรคโดยให้เชื้อทั้งสองห่างกัน 6 เซนติเมตร หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 จาน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทุกวันเป็นเวลา 10 วัน แยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

5.2 การทดสอบด้วยวิธี Detached fruit

ทำการทดสอบกับองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยนำผลองุ่นมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำผสมสารลดแรงตึงผิว แล้วผึ่งให้แห้ง ใส่ลงบนตะแกรงที่วางในกล่องพลาสติกที่เติมน้ำเพื่อให้ความชื้น นำเชื้อราทดสอบที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7-10 วัน เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงในจาน กวาดสปอร์บนผิวหน้าอาหารแล้วปรับให้มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อช่อ บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อช่อ บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Yeast extract-Malt extract broth (YMB) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย haemacytometer

พ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย หรือยีสต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อช่อ ลงบนผิวผลองุ่น บ่มไว้ 24 ชั่วโมงจึงพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรเท่ากันลงไป บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน

ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตการพัฒนาของแผล บันทึกผลเป็นขนาดพื้นที่แผล และนำมาคำนวณหาอัตราการยับยั้งการเกิดโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.การทำเครื่องหมายตัวตรวจ (marker)

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ มาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เพื่อง่ายต่อการติดตามตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปหยดและเกลี่ยบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 1 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารดังกล่าว มา streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 2-3 ครั้งเพื่อให้เกิดความคงตัว และเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะขึ้นเป็น 5 10 20 50 และ 100 ppm ตามลำดับ (สุพจน์, 2545; จิรัสสา, 2547)

หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เครื่องหมายตัวตรวจที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการอีกครั้ง แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีไปทดสอบความสามารถในการลดโรคแอนแทรคโนสในสภาพโรงเรือนทดลอง

7. การทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคองุ่นในสภาพแปลงปลูก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete block design, RCB) ทำการทดลอง 6 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ (block) ซ้ำละ สี่ต้น ขนาดพื้นที่ของค้างองุ่นรวม 1.75 x 1.50 ตารางเมตรต่อซ้ำ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือนทดลอง นำมาใช้ทดสอบ กรรมวิธีควบคุมนั้นใช้น้ำเปล่าพ่นแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทุกแปลงในสวนองุ่น มีการพ่นสารเคมี แมนโคแซบ คาร์เบนดาซิม และสารเคมีฆ่าแมลง เชื้อราปฏิปักษ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ และยีสต์ปฏิปักษ์ ผลิตและเตรียมในรูปสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย และเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์ ตามลำดับ พ่นในแปลงองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการตัดแต่งกิ่งจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต ทุก 7 วัน รวม 10 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บันทึกผลการทดลองและข้อมูลปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

7.1 ตรวจผลการทดลองโดยประเมินโรคในกิ่งอ่อน ใบอ่อนและช่ออ่อน ตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (CFU/g) ของกิ่งอ่อน ใบอ่อน และผลอ่อน ก่อนและหลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ประเมินโรคบนช่อผลทุกครั้งก่อนพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หรือน้ำนึ่งฆ่าเชื้อบนช่อผลอ่อน แบ่งระดับการเกิดโรคบนช่อผล เป็น 5 ระดับ (Christopher *et al*., 2007) คือ

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการโรค
ระดับ 1 แสดงอาการ 1 หรือ 2 ผลต่อช่อ
ระดับ 2 แสดงอาการหนึ่งในสิบถึงหนึ่งในสี่ส่วนของช่อผล
ระดับ 3 แสดงอาการหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่งของช่อผล
ระดับ 4 แสดงอาการมากกว่าครึ่งหนึ่งของช่อผล

7.2 ขนาดของช่อผล นำช่ออ่อนซ้ำละ 5 ช่อ มาวัดความกว้างของช่อผล ความยาวของช่อผล โดยวัดปริมาณส่วนที่กว้างกับส่วนที่ยาวที่สุดของช่อผล โดยใช้ไม้บรรทัด จากนั้นหาค่าเฉลี่ยมีหน่วยเป็นเซนติเมตร และชั่งน้ำหนักช่อผล หาน้ำหนักช่อผลเฉลี่ยมีหน่วยเป็นกรัม

7.3 ขนาดของผล สุ่มผลอ่อนจากกลางช่อมา 5 ผลต่อช่อ จำนวน 25 ผลต่อซ้ำ นำมาวัดความกว้างผล ความยาวผล โดยใช้ vernier calipers แล้วหาค่าเฉลี่ยมีหน่วยเป็นเซนติเมตร และน้ำหนักผลเฉลี่ย

7.4 เปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) สุ่มผลอ่อนจากกลางช่อมา 5 ผลต่อช่อ จำนวน 25 ผลต่อซ้ำ นำมาคั้นน้ำ วัดค่าเปอร์เซ็นต์ TSS โดยใช้ Hand Refractrometer หาค่าเฉลี่ยมีหน่วยวัดเป็นเปอร์เซ็นต์

7.5 เปอร์เซ็นต์ tritratable acidity (TA) นำน้ำคั้นที่เหลือจากการวัดเปอร์เซ็นต์ TSS กรองด้วยสำลี เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ TA โดยการไตเตรท ซึ่งใช้น้ำคั้นอ่อน 10 มิลลิลิตร ใช้ phenolphthalein 1 เปอร์เซ็นต์ 2 หยด เป็น indicator ไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N จนมีการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อใกล้ถึงจุดยุติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ TA = จำนวนมิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

จำนวนมิลลิลิตรของน้ำคั้นองุ่นที่ใช้

7.6 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ TSS ต่อ เปอร์เซ็นต์ TA (TSS/TA) สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{TSS/TA} = \frac{\text{เปอร์เซ็นต์ TSS}}{\text{เปอร์เซ็นต์ TA}}$$

8. การทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว

นำช่อองุ่นจากวิธีการใน ข้อ 7 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคบนผลองุ่น โดยการทำแผลบนช่อองุ่นด้วยเข็ม 3 แผลต่อผล จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อช่อองุ่น บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน

ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตการพัฒนาของแผล บันทึกผลเป็นขนาดพื้นที่แผล และนำมาคำนวณหาอัตราการยับยั้งการเกิดโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด

9.จำแนกเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NGA ศึกษาดูลักษณะและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบแกรมด้วย 3 % KOH และการย้อมแกรมแบคทีเรีย ก่อนนำไปจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Microflex MALDI-TOF และโปรแกรม MALDI-Biotyper

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากการทดลอง โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows V. 11.5 ตามแผนการทดลองแบบ CRD ซึ่งทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ และแผนการทดลองแบบ RCB ในสภาพโรงเรือนทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

สวนองุ่นของคุณบุญส่ง ธรรมรักษากุล ตั้งอยู่หมู่ที่ 8 ตำบลท่านัด อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 –ตุลาคม พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในองุ่น และการพิสูจน์โรค

จากการศึกษาอาการโรคแอนแทรคโนสขององุ่นพบว่า ลักษณะอาการบนผล สามารถเป็นได้กับผลทุกระยะตั้งแต่เล็กจนโต ในผลอ่อนที่เป็นโรคจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ขอบแผลมีสีเข้ม ถ้าอากาศชื้นๆจะเห็นจุดสีชมพูถึงสีส้มตรงกลางแผล ส่วนในผลแก่ที่ผลองุ่นเริ่มเข้าสีจะเห็นบริเวณที่เน่าเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีชมพู สีส้ม เกิดขึ้นตรงกลางแผล (ภาพที่ 1-A) ถ้าโรคยังคงเป็นต่อไปจะทำให้แผลแห้ง เปลือกเหี่ยว ผลติดกับช่อไม่ร่วงหล่น เมื่อถูกน้ำหรือน้ำค้างเชื้อโรคก็จะแพร่ไปยังผลอื่นภายในช่อ จนกระทั่งผลเน่าเสียหมดทั้งช่อ (ภาพที่ 1-B)

ลักษณะอาการบนยอดอ่อน เริ่มจากเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลเข้มต่อมาขอบแผลขยายออกตามความยาวของกิ่ง มีลักษณะหัวแหลมท้ายแหลม ขอบแผลเป็นสีน้ำตาลแก่ถึงดำ กลางแผลสีดำขรุขระ (ภาพที่ 1-E, ภาพที่ 1-C) ในช่วงฤดูฝนที่อากาศมีความชื้นสูงจะเห็นเป็นจุดเล็กๆ สีชมพูตรงกลางแผล ถ้าเป็นแผลมากๆ ยอดจะแคระแกร็น มีการแตกยอดมาก แต่ยอดที่แตกออกมาแล้วแคระแกร็นไม่เติบโตต่อไป ใบที่แตกใหม่มีขนาดเล็กและสีซีดผิดปกติ ในที่สุดกิ่งนั้นก็จะตายไป

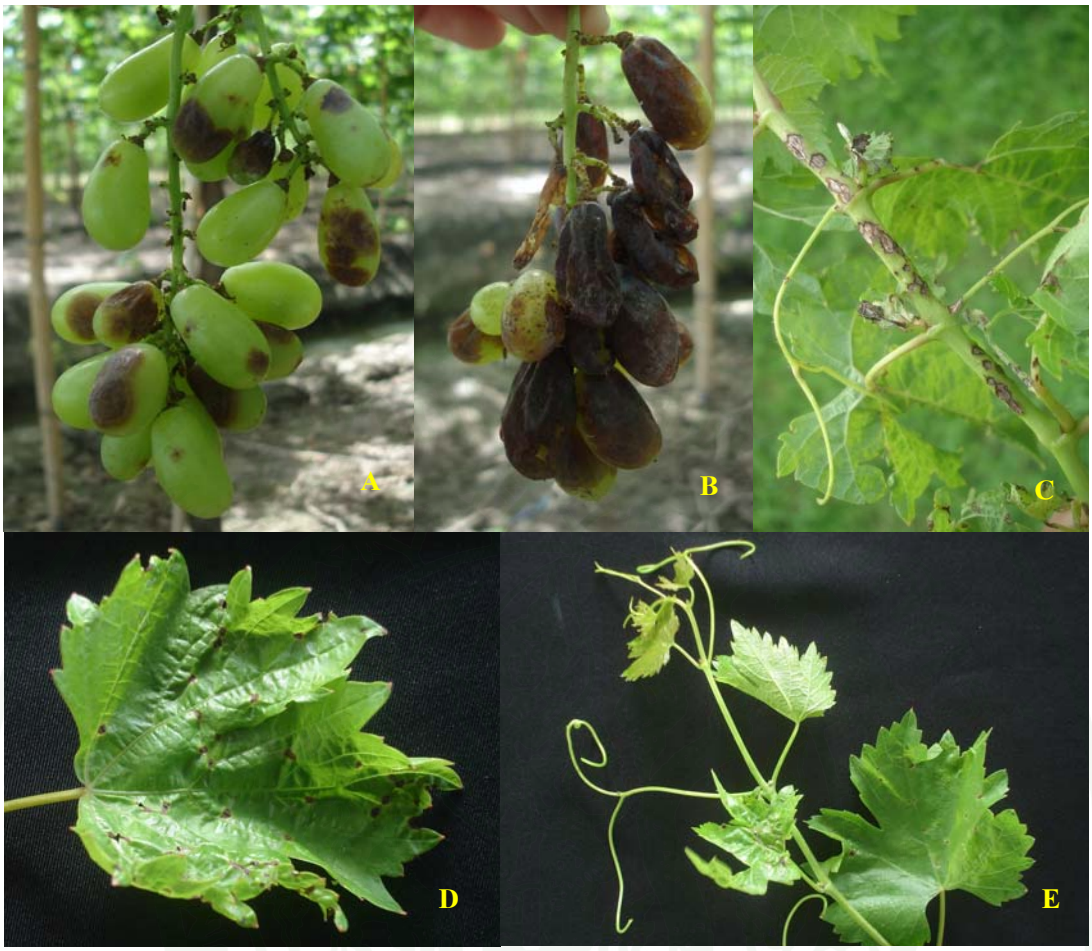
ลักษณะอาการบนใบ ส่วนใหญ่เป็นกับใบอ่อนที่เพิ่งแตกใหม่ เห็นเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น รูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม ถ้าอากาศแห้งเนื้อเยื่อจะหลุดไป ทำให้ใบเป็นรู (ภาพที่ 1-D) ถ้าเป็นที่เส้นกลางใบจะเห็นใบม้วนงอทางด้านล่าง แผลสีน้ำตาลเข้มและบุ๋มลึกลงไป แผลเป็นรูปไข่และขยายตามความยาวของก้านใบ ใบที่เป็นโรคไม่เติบโตต่อไป ถ้าเป็นมากๆ ใบมักจะร่วงเหลือแต่เถาเท่านั้น

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นจากใบองุ่นและผลองุ่นพบว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งมีลักษณะของเส้นใยสีเทา ฟู สร้าง spore mass สีส้ม (ภาพที่ 2-A) เมื่อเชื้อรามีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ ลักษณะspore มีลักษณะรูปไข่ หัวท้ายมน มีเซลล์เดียว สี hyaline ไม่มี septum (ภาพที่ 2-B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการนำเชื้อราที่แยกได้จากใบองุ่นและผลองุ่นเป็นโรคไปปลูกเชื้อลงบนใบและผลองุ่นเพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) พบว่าใบและผลเริ่มแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 72 ชั่วโมง โดยเริ่มเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลที่ใบและผล หลังจากนั้นบริเวณแผลเริ่มเปลี่ยนสีขอบแผลเป็นสีน้ำตาล แผลขยายขนาดอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างสารเมือกสีส้มซึ่งภายในมีสปอร์จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วแผล และเมื่อนำผลองุ่นและใบมาแยกเชื้อสาเหตุอีกครั้งบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหมือนเดิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสขององุ่น

A. อาการบนผลองุ่นที่แสดงเริ่มต้น

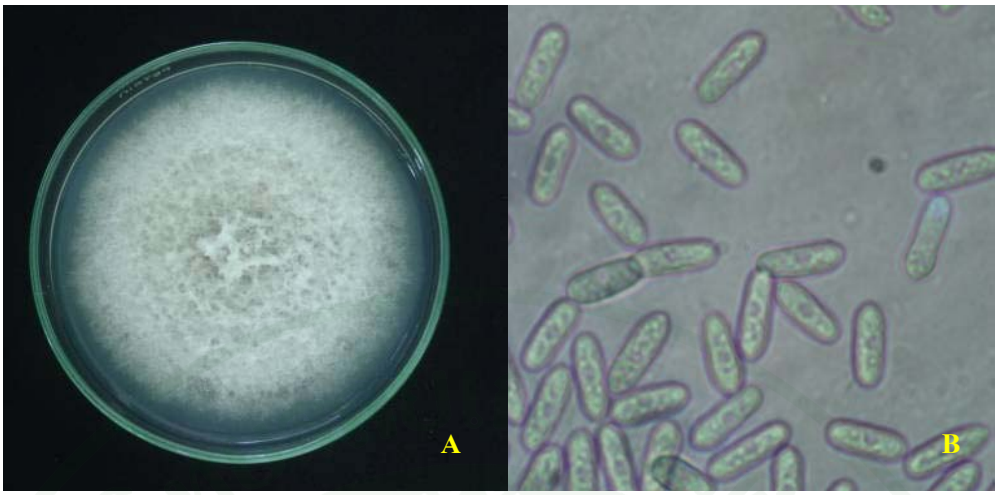
B. อาการบนผลองุ่นที่แสดงอาการผลแห้งเหี่ยว

C. อาการบนกิ่งองุ่น

D. อาการบนใบ

E. อาการที่ยอดอ่อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

A. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C.gloeosporioides*

B. ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบองุ่น

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบองุ่นมีทั้งหมด 90 ไอโซเลท แต่เมื่อนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้ง มีจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีอยู่เพียง 47 ไอโซเลท เท่านั้น โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา 24 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท และยีสต์ 8 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบอุ่นด้วยวิธีการต่าง ๆ

ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนไอโซเลทของจุลินทรีย์จากใบอุ่น		
	การพิมพ์ใบ [1/] (DLP)	การแยกเชื้อบนผิวใบ[2/] (Epi)	การแยกเชื้อในผิวใบ[3/] (Endo)
รา	11	11	2
แบคทีเรีย	-	4	11
ยีสต์	-	7	1

หมายเหตุ [1/] DLP = Diseased leaf printing technique

[2/] Epi = Epiphyte

[3/] Endo = Endophyte

จากตารางที่ 2 พบว่า การพิมพ์ใบอุ่นที่เป็นโรคโดยตรง (Diseased leaf printing; DLP) และการแยกเชื้อบนผิวใบอุ่น (Epiphyte; Epi) สามารถแยกเชื้อราบนผิวใบ ได้ในปริมาณเท่าเทียมกัน (11 ไอโซเลท) วิธีล้างผิวชิ้นใบอุ่นสามารถแยกยีสต์บนผิวใบ (7 ไอโซเลท) ในขณะที่วิธีฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นใบอุ่นด้วย 0.525% sodium hypochlorite สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียใต้ผิวใบ (Endophyte; Endo) ได้ถึง 11 ไอโซเลท ขณะที่การพิมพ์ใบอุ่นแยกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ไม่ได้เลย

3. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบพืชในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

3.1 การยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้จากใบอุ่นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนใบอุ่นและผลอุ่น พบว่าเชื้อราทดสอบที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราทดสอบต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ 4 แบบ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบบที่ 1 เชื้อราทดสอบสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ซึ่งมีเพียงไอโซเลทเดียว คือ ไอโซเลท DLP1-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 56.40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3-B)

แบบที่ 2 เชื้อราทดสอบเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* แต่ไม่พบการเจริญคลุมทับ เช่น ไอโซเลท DLP1-5 DLP8-3 ซึ่งจำแนกเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อรา *Nigrospora* sp. โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 65.60 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3-C)

แบบที่ 3 เชื้อราทดสอบเจริญมาชนกับเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เพียงเล็กน้อยขึ้น โดยเกิดเป็นรอยสีเขียวตรงบริเวณที่เชื้อราเจริญมาชนกัน เช่น ไอโซเลท Epi6-1 Epi8-1 ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 43.00 และ 56.40 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3-D)

แบบที่ 4 เชื้อราทดสอบสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เกิดเป็นบริเวณ clear zone มีเพียงไอโซเลทเดียว คือ ไอโซเลท Epi 3-2 โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 45.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3-E)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 รัศมีโคโลนี และประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากใบองุ่นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 10 วัน

ไอโซเลท	รัศมีของเชื้อราทดสอบ (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (%)[1/]	รูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์
Cg. (control)	6.88	-	
DLP 1-2	4.23 [2/] a[3/]	56.40 bcd	แบบที่ 1
DLP 1-3	2.87 fg	43.31 ghi	แบบที่ 3
DLP 1-5	3.77 b	65.60 a	แบบที่ 2
DLP 2-2	2.43 h	37.67 i	UN[4/]
DLP 3-1	2.30 h	39.00 hi	UN
DLP 3-2	3.20 def	53.33 cde	UN
DLP 4-1	3.13 def	50.33 def	แบบที่ 3
DLP 4-4	2.93 efg	46.33 fg	แบบที่ 3
DLP 8-1	3.23 de	56.67 bcd	UN
DLP 8-3	3.60 bc	53.33 cde	แบบที่ 2
DLP 8-4	3.37 cd	51.33 def	แบบที่ 3
Epi 1-1	3.03 d-g	41.86 ghi	แบบที่ 3
Epi 3-2	1.37 i	45.25 fgh	แบบที่ 4
Epi 4-1	1.57 i	25.33 j	UN
Epi 4-3	3.37 cd	53.00 de	แบบที่ 3
Epi 5-3	1.63 i	31.00 j	UN
Epi 5-4	3.17 def	42.33 ghi	แบบที่ 3
Epi 6-1	2.87 fg	43.00 ghi	แบบที่ 3
Epi 6-2	3.30 cd	60.27 ab	แบบที่ 3
Epi 7-1	2.87 fg	50.33 def	UN
Epi 7-3	3.70 b	59.67 abc	แบบที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	รัศมีของเชื้อรา ทดสอบ (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (%)	รูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์
Epi 8-1	3.20 def	56.40 bcd	แบบที่ 3
Endo 4-1	3.30 cd	48.33 efg	UN
Endo 4-2	2.20 h	38.33 i	UN
Epi A	2.73 g	43.67 ghi	UN

หมายเหตุ [1/] เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี)ของเชื้อโรคพืชในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร[(C – T)/C] x 100 โดยที่
C = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานควบคุม
T = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

[2/] เชื้อราสามารถเจริญคลุมทับ (over grow) เชื้อโรคได้

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

[4/] UN = ไม่สามารถอธิบายรูปแบบที่แน่นอน เช่น เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โตช้ากว่าเชื้อราสาเหตุโรค

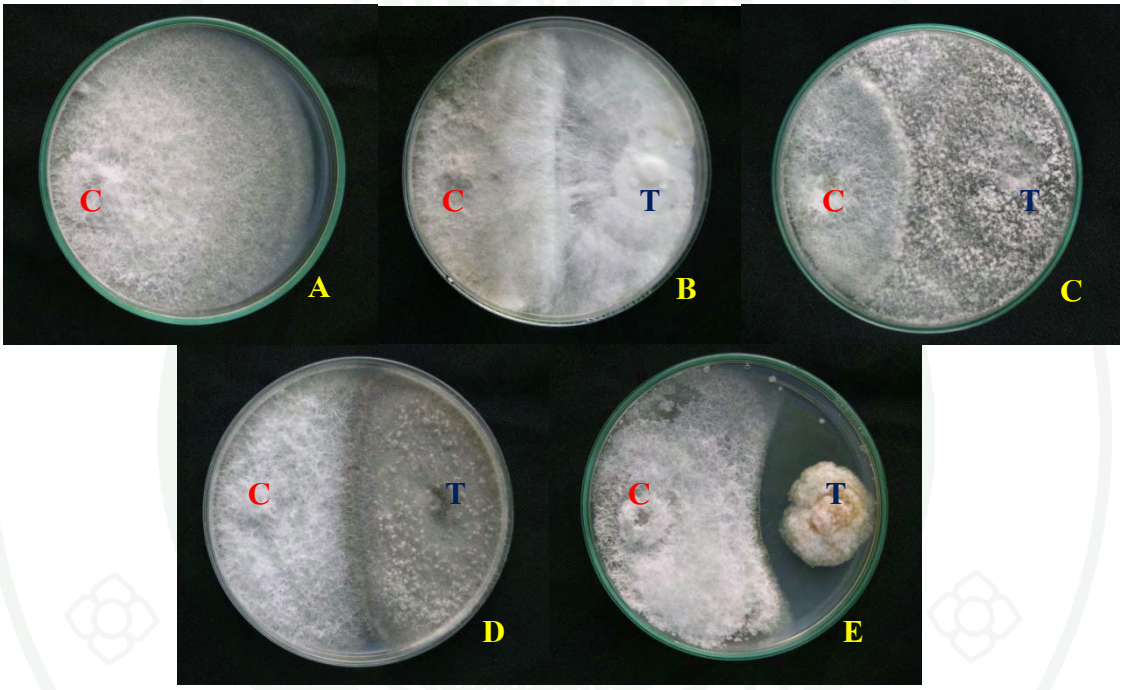
จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า เชื้อราไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือไอโซเลท DLP 1-5 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ถึง 65.60 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีรัศมีการเจริญของโคโลนีเฉลี่ย 3.77 เซนติเมตร และมีรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์เป็นแบบที่ 2 ซึ่งเชื้อราทดสอบสามารถแข่งขันในการใช้อาหารเพื่อเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เชื้อราทดสอบเจริญได้รวดเร็วกว่า อย่างไรก็ดี การทดสอบในเบื้องต้นพบว่าเชื้อราทดสอบนี้เป็นเชื้อรา *Nigrospora* sp.

สำหรับไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพรองลงมาได้แก่ไอโซเลท Epi 6-2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 60.27 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัศมีการเจริญของโคโลนีเฉลี่ย 3.30 เซนติเมตรและมีรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์เป็นแบบที่ 3 ซึ่งเป็นรูปแบบส่วนใหญ่ของเชื้อราที่มีความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคที่พบในการทดลองครั้งนี้

ส่วนไอโซเลท DLP 1-2 ที่เป็นเชื้อราทดสอบเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถเจริญคลุมทับเชื้อราสาเหตุโรคได้นั้น แม้ว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียง 56.4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น



ภาพที่ 3 รูปแบบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ (T) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (C) บนอาหาร PDA หลังทดสอบ 10 วัน

A. กรรมวิธีควบคุม : เชื้อรา *C. gloeosporioides* อายุ 10 วัน

B. การเจริญแบบที่ 1 : เจริญคลุมทับเชื้อรา *C. gloeosporioides*

C. การเจริญแบบที่ 2 : เจริญแข่งขันกับเชื้อรา *C. gloeosporioides*

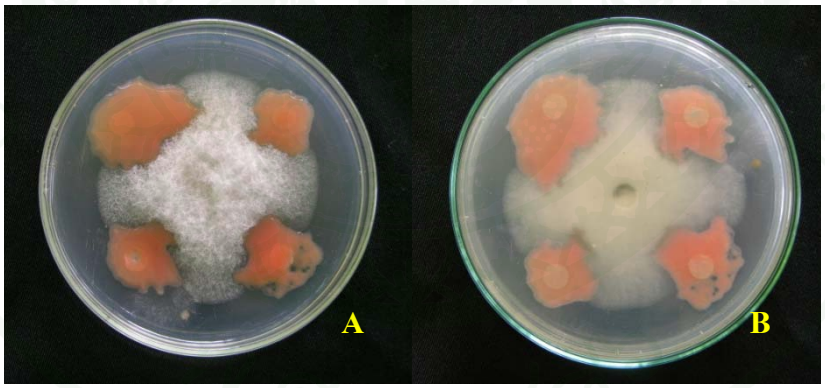
D. การเจริญแบบที่ 3 : เจริญมาชนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* แล้วเกิดการเจริญคลุมทับเล็กน้อย

E. การเจริญแบบที่ 4 : สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อนำเอายีสต์ที่แยกได้จากใบองุ่นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนใบองุ่น พบว่ายีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดย ยีสต์ไอโซเลท Epi 7(1) Epi 5(2) และ Epi 3(2) เจริญได้เร็วแม้ว่าจะไม่สามารถสร้างปฏิชีวนสารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระยะแรก แต่ในระยะต่อมา เมื่อยีสต์สัมผัสกับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว ยีสต์สามารถเจริญลามเข้ามายังเส้นใย แล้วทำให้บริเวณเส้นใยเชื้อราที่สัมผัสกับยีสต์ยุบตัวลงได้ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4) และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 51.51 และ 50.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากใบองุ่น พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ (ตารางที่ 4) ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(2) และ Endo 3(1) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 55.67 และ 54.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแม้กลับมาตรวจผลการทดลองในภายหลัง (10 วันหลังเริ่มทดสอบ) ก็ยังพบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังหยุดการเจริญอยู่เช่นเดิม (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ยีสต์ไอโซเลท Epi 7(1) เจริญลามเข้าไปตามเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA หลังวางเชื้อพร้อมกัน เป็นเวลา 5 วัน A. ด้านหน้าจานเลี้ยงเชื้อ B. ด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 รัศมีโคโลนี และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ของยีสต์ และแบคทีเรียที่แยกได้จากใบอ่อนด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 10 วัน

ไอโซเลท	ชนิด	รัศมีการเจริญของจุลินทรีย์ (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (%)[1/]
Cg. (Control)		3.25	-
Epi 3(2)	ยีสต์	2.31 bc[2/]	50.33 ab
Epi 4(1)	ยีสต์	1.12 g-l	8.00 d
Epi 4(4)	ยีสต์	2.32 bc	10.00 d
Epi 5(2)	ยีสต์	2.63 b	51.00 ab
Epi 6(1)	ยีสต์	1.75 ef	9.67 d
Epi 6(2)	ยีสต์	1.92 de	43.00 c
Epi 7(1)	ยีสต์	2.54 b	51.00 ab
Endo 7(3)	ยีสต์	2.12 cd	46.33 bc
Epi 3(3)	แบคทีเรีย	0.82 l	0.00 e
Epi 4(3)	แบคทีเรีย	0.89 kl	7.67 d
Epi 8(1)	แบคทีเรีย	1.51 fg	12.33 d
Epi 8(3)	แบคทีเรีย	0.92 jkl	12.33 d
Endo 2(1)	แบคทีเรีย	1.22 g-k	53.00 ab
Endo 2(2)	แบคทีเรีย	2.29 bc	55.67 a
Endo 2(3)	แบคทีเรีย	3.42 a	52.33 ab
Endo 3(1)	แบคทีเรีย	1.34 ghi	54.33 a
Endo 5(1)	แบคทีเรีย	1.35 ghi	53.33 ab
Endo 5(2)	แบคทีเรีย	1.07 i-l	52.67 ab
Endo 7(1)	แบคทีเรีย	1.10 h-l	52.67 ab
Endo 7(2)	แบคทีเรีย	1.47 fgh	51.67 ab
Endo 7(3)	แบคทีเรีย	1.29 g-j	50.67 ab
Endo 7(5)	แบคทีเรีย	1.36 ghi	48.33 abc
Endo 8(2)	แบคทีเรีย	1.40 f-i	49.67 abc

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

หมายเหตุ [1/]เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร [(C – T)/C] x 100

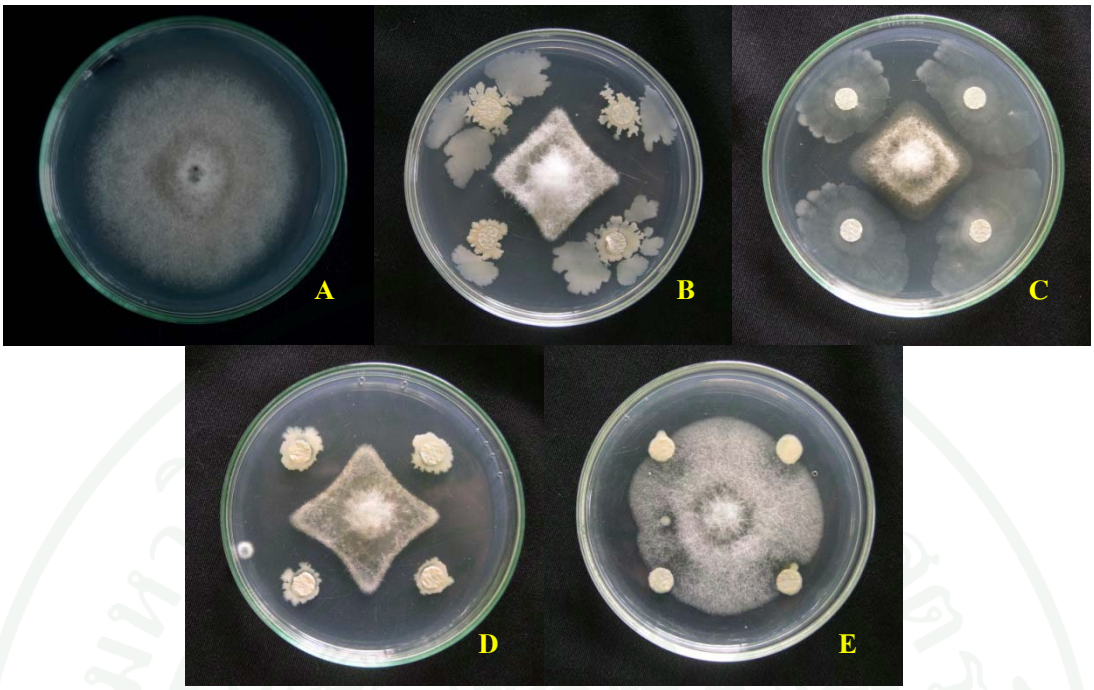
โดยที่

C = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานควบคุม

T = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากใบอ่อนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar หลังจากวางเชื้อพร้อมกัน 5 วัน

A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา *C. gloeosporioides*)

B. เชื้อแบคทีเรีย โอโซเลท Endo 2(2)

C. เชื้อแบคทีเรียโอโซเลท Endo 2(3)

D. เชื้อแบคทีเรีย โอโซเลท Endo 5(1)

E. เชื้อแบคทีเรียโอโซท Epi 4(3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การยับยั้งการเกิดโรคบนผลองุ่น

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ดีในแต่ละแบบ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลองุ่นทั้งหมด 10 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 5 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรา ไอโซเลท DLP 1-2, DLP 3-2, DLP 8-3, Epi 3-2 และ Epi 6-2 เชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(1), Endo 2(2), Endo 2(3) และ Endo 2(1) ยีสต์ 1 ไอโซเลท คือ ยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทสามารถควบคุมโรคบนผลองุ่นได้ โดยมีพื้นที่แผลบนผลองุ่นน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 6 โดยที่เชื้อราไอโซเลท DLP 8-3, Epi 3-2 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(2) และยีสต์ไอโซเลท Epi 3(2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคบนผลองุ่นได้ถึง 86.90 74.60 86.90 และ 78.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

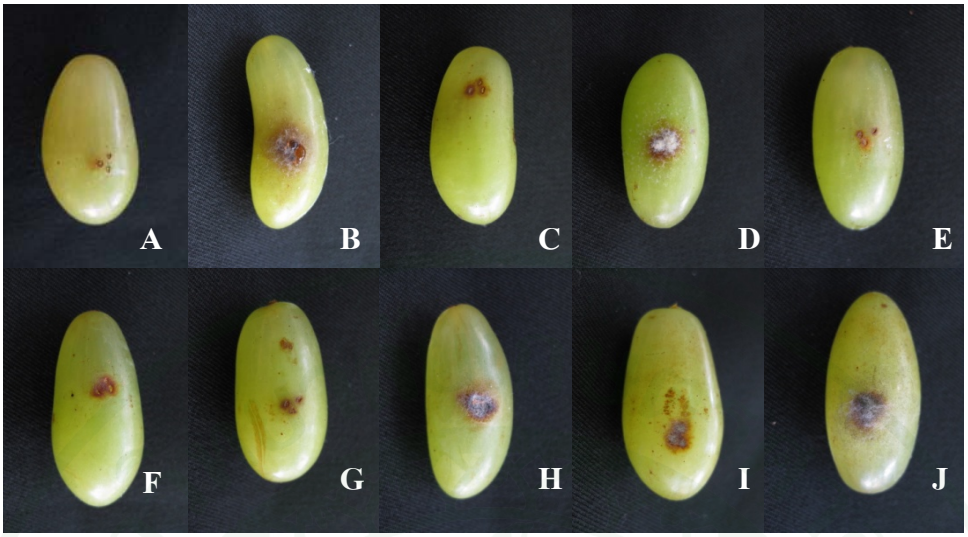
ตารางที่ 5 พื้นที่แผลบนผลอุ่น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลอุ่น พันธุ์ไวท์มะละกาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวใบอุ่น เมื่อปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.)ไปแล้ว 7 วัน

ไอโซเลท	ชนิด	พื้นที่แผลบนผลอุ่น (มม.^{2})	การยับยั้งการเกิดโรคบนผลอุ่น (%)[1/]
Cg.		63.00 a [2/]	-
DLP 1-2	รา	23.75 cd	62.30 bc
DLP 3-2	รา	41.75 d	33.72 bc
DLP 8-3	รา	8.25 d	86.90 a
Epi 3-2	รา	16.00 d	74.60 ab
Epi 6-2	รา	33.25 bc	47.22 cd
Endo 2(1)	แบคทีเรีย	24.25 cd	61.50 bc
Endo 2(2)	แบคทีเรีย	8.25 d	86.90 a
Endo 2(3)	แบคทีเรีย	23.00 cd	63.49 bc
Endo 3(1)	แบคทีเรีย	35.00 bc	44.44 cd
Epi 3(2)	ยีสต์	13.25 d	78.96 ab

หมายเหตุ [1/]เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคบนผลอุ่นคำนวณจากความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม ตามสูตร $100 - \frac{[\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ}]}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}}$

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบองุ่นในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 7 วัน

A. กรรมวิธีควบคุม (-Cg.)

B. กรรมวิธีควบคุม (+Cg.)

C. กรรมวิธีที่พ่นด้วย DLP1-2

D. กรรมวิธีที่พ่นด้วย DLP3-2

E. กรรมวิธีที่พ่นด้วย DLP8-3

F. กรรมวิธีที่พ่นด้วย Endo 2(1)

G. กรรมวิธีที่พ่นด้วย Endo 2(2)

H. กรรมวิธีที่พ่นด้วย Endo 3(1)

I. กรรมวิธีที่พ่นด้วย Epi 3(2)

J. กรรมวิธีที่พ่นด้วย Epi 6(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้จากใบองุ่นและที่มีอยู่เดิม

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากใบองุ่น ซึ่งได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(1), Endo 2(2), Endo 2(3) และ Endo 3(1) นำมาทดสอบซ้ำอีกรอบร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ BB 165 และ สายพันธุ์ DGg 13 เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, สายพันธุ์ T-50, สายพันธุ์ M23, สายพันธุ์ PM 9 และสายพันธุ์ 01-52

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* 5 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Dual culture test บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นได้ โดยทุกสายพันธุ์สามารถเจริญคลุมทับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ยกเว้นเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ M23 (ตารางที่ 6, ภาพที่ 7)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลท ด้วยวิธี spot inoculation บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ BB165, Endo2(1), Endo2(2), Endo2(3) และ Endo3(1) ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดเป็น clear zone (ตารางที่ 7, ภาพที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ต่าง ๆ (Th) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg.) ด้วยวิธี Dual culture หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน

สายพันธุ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา	รัศมีการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* [1/] (%)	อัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* [2/] (ซม./วัน)
Control	6.52	-	-
Th-CB-Pin-01	3.38	48.23 ab[3/]	0.73
Th-T50	3.45	47.08 abc	0.68
Th-01-52	3.65	43.74 c	0.47
Th-PM9	3.30	49.38 a	0.67
Th-M23	3.58	45.17 bc	0.00

หมายเหตุ [1/] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้จากสูตร

(R1-R2)/R1 x 100

R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคในจานควบคุม (เซนติเมตร)

R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มาหลังหยุดการเจริญ (เซนติเมตร)

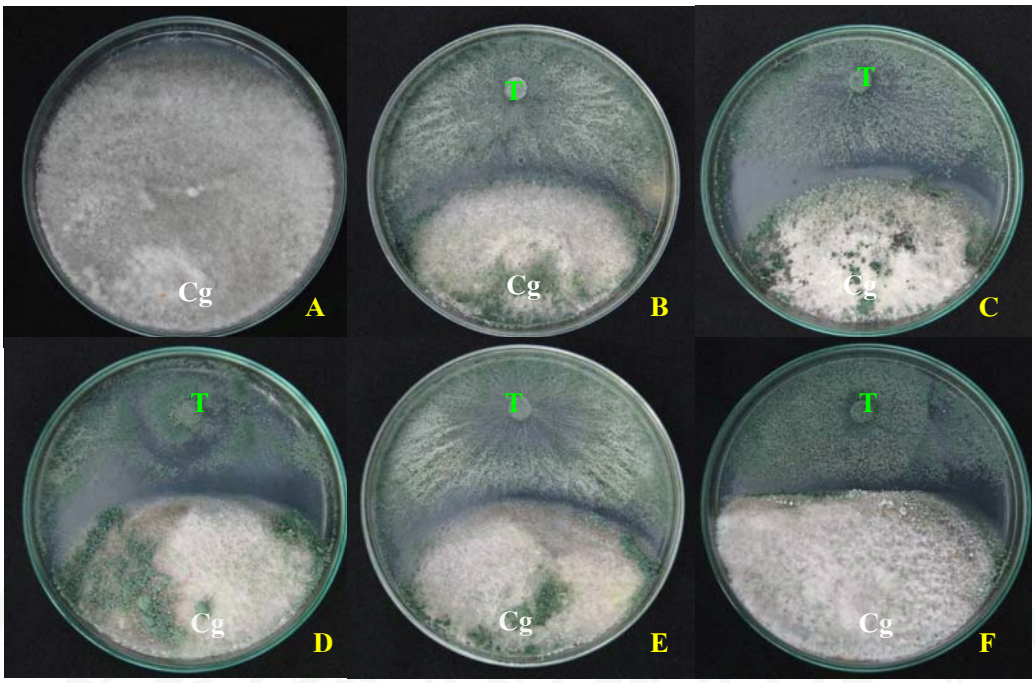
[2/] อัตราการเจริญคลุมทับเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้จากสูตร (D x 1)/T (เซนติเมตร/วัน)

D = ระยะทางที่เชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุมทับเชื้อโรค ซึ่งเริ่มวัดจากจุดที่เชื้อปฏิปักษ์เจริญชนกับเชื้อโรค แล้ว เจริญคลุมทับเชื้อโรคจนสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อ (เซนติเมตร)

T = ระยะเวลาที่เชื้อราปฏิปักษ์ไตรโคเดอร์มาใช้ในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคนับตั้งแต่จุดที่เชื้อโรคและเชื้อราปฏิปักษ์เจริญมาชนกันจนสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อ (วัน)

[3/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ต่าง ๆ (T) ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่น โดยวิธี Dual culture

A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา *C. gloeosporioides*)

B. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

C. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50

D. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ 01-52

E. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM9

F. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ M23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ (Bs) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี spot inoculation หลังวางเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	รัศมีการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* [1/] (%)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (cm)
Control	4.5	-	-
Bs-Endo 2(1)	1.66	63.06 a[2/]	0.99
Bs-Endo 2(2)	1.61	64.15 a	1.00
Bs-Endo 2(3)	1.66	63.03 a	0.52
Bs-Endo 3(1)	1.65	63.30 a	1.00
Bs-BB165	1.70	62.20 a	1.00
Bs-DGg13	2.67	41.64 b	-

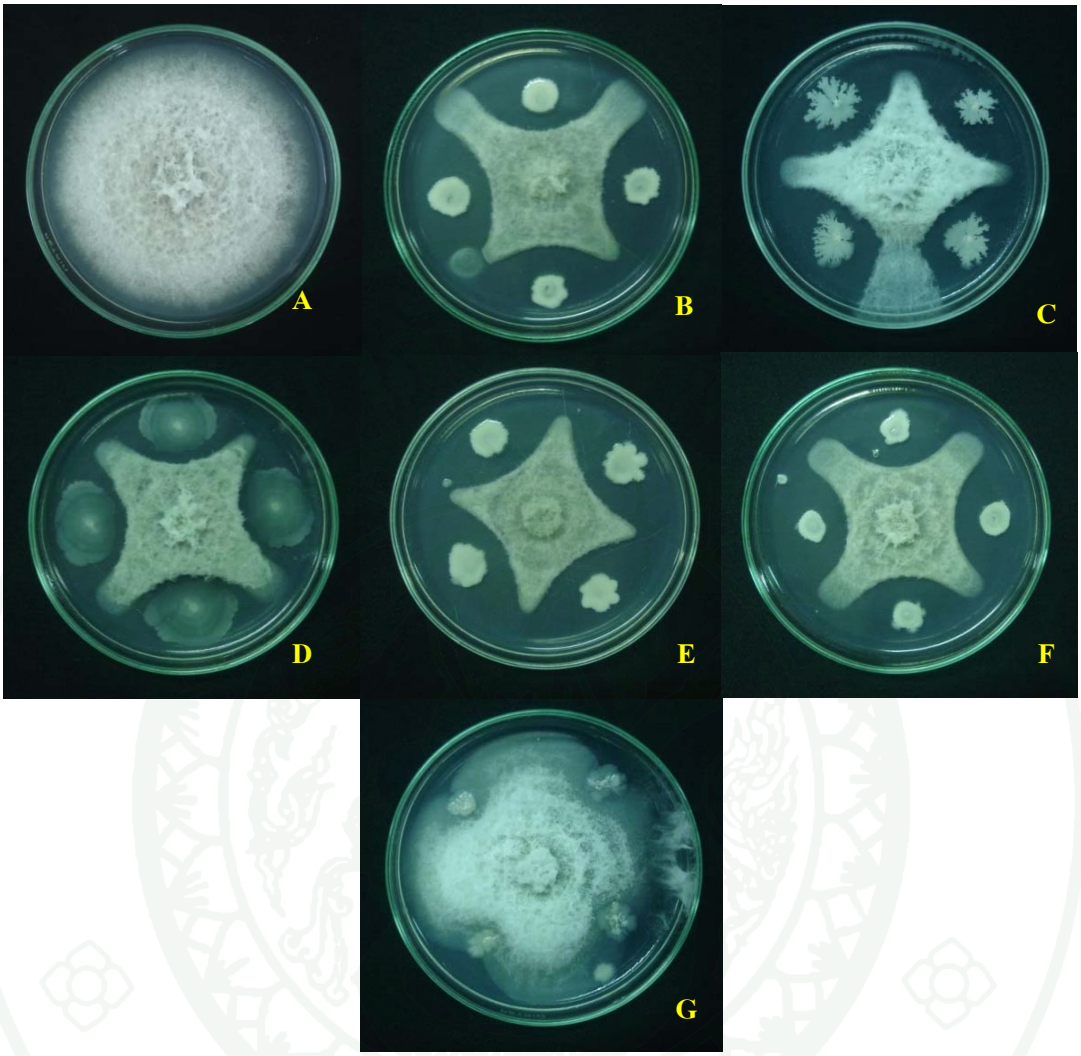
หมายเหตุ [1/]เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย = (R1 – R2)/ R1x 100

R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีทดสอบ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นโดยวิธี spot inoculation

A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา *C. gloeosporioides*)

B. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(1)

C. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

D. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(3)

E. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 3(1)

F. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165

G. เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท DGg

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การพัฒนาแบคทีเรียให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ มาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *C.gloeosporioides* พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(1) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย ไอโซเลท M1-M5- Endo 2(1) เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท Endo 2(2) สายพันธุ์ดั้งเดิม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างกันกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธ์กลาย M3-Endo 2(2), M4-Endo 2(2) และ M5-Endo 2(2) แต่กลับพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย M1- Endo 2(2) และ M2- Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคลดลง(ความกว้างบริเวณยับยั้งลดลง) (ตารางที่ 8) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท Endo 2(3), Endo 3(1), BB165 และ DGg 13 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่ต้านทาน rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี spot inoculation หลังวางเชื้อรา บนอาหาร potato dextrose agar 7 วัน

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	รัศมีการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* [1/] (%)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (cm)
Control	4.5	-	-
Endo 2(1)*	1.65	63.33 a[2/]	1.00
M1- Endo 2(1)	1.93	58.22 c	1.00
M2- Endo 2(1)	1.78	60.00 bc	1.00
M3- Endo 2(1)	1.99	55.84 d	0.99
M4- Endo 2(1)	1.88	58.34 c	1.00
M5- Endo 2(1)	1.78	60.56 b	0.99
CV. (%)	-	2.92	-
Endo 2(2)*	1.56	65.28 a	1.00
M1- Endo 2(2)	1.81	59.11 b	0.63
M2- Endo 2(2)	1.79	61.48 b	0.50
M3- Endo 2(2)	1.60	64.44 a	0.50
M4- Endo 2(2)	1.58	64.99 a	0.60
M5- Endo 2(2)	1.61	64.16 a	0.50
CV. (%)	-	3.84	-
Endo 2(3)*	1.41	68.61 a	0.51
M1- Endo 2(3)	1.68	63.56 b	0.33
M2- Endo 2(3)	1.58	64.44 b	0.40
M3- Endo 2(3)	1.75	61.11 b	0.41
M4- Endo 2(3)	1.76	60.56 b	0.45
M5- Endo 2(3)	1.98	56.12 c	0.43
CV. (%)	-	6.03	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	รัศมีการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ซม.)	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* [1/] (%)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (cm)
Endo 3(1)*	1.59	64.72 a[2/]	0.96
M1- Endo 3(1)	1.86	58.22 c	0.98
M2- Endo 3(1)	1.95	56.67 cd	1.00
M3- Endo 3(1)	1.98	56.12 d	0.98
M4- Endo 3(1)	1.80	60.00 b	1.00
M5- Endo 3(1)	2.00	55.66 d	0.94
CV. (%)	-	2.95	-
BB165*	1.60	64.44 a	1.03
M1- BB165	1.93	57.11 c	1.00
M2- BB165	1.88	58.89 b	1.00
M3- BB165	1.78	60.55 b	0.98
M4- BB165	1.75	61.11 b	1.00
M5- BB165	1.76	60.83 b	1.00
CV. (%)	-	3.45	-
DGg13*	2.48	44.99 a	-
M1- DGg13	2.50	43.33 b	-
M2- DGg13	2.75	38.89 c	-
M3- DGg13	2.54	43.61 ab	-
M4- DGg13	2.50	44.44 ab	-
M5- DGg13	2.50	44.44 ab	-
CV. (%)	-	3.09	-

หมายเหตุ [1/] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย = (R1 – R2)/ R1x 100

R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

[2/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา และแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นด้วยวิธี Detached fruits

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม 6 ไอโซเลท และแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย (mutant) 6 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ที่ระยะเวลา 5 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคได้ที่ 74.30-93.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 9 และ10) โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท Endo 2(2) สายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้สูงสุด 93.31 และ 93.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) แบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ดั้งเดิม (Bs) และ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลาย (Bs-M) ต่อพื้นที่แผลบนผลองุ่น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา และค่า total soluble solid (TSS) หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 5 วัน

กรรมวิธี	พื้นที่แผลบนผลองุ่น (มม.^{2})	การยับยั้งการเกิดโรคบนผลองุ่น[1/] (%)	TSS (%)
Control	106.33	-	18.25 a-d
คาร์เบนดาซิม (1,000 ppm)	18.78	82.34 abc[2/]	18.60 abc
Th-CB-Pin-01	10.11	90.49 ab	18.75 a
Th-T50	10.89	89.76 ab	17.80 a-e
Th-PM9	10.11	90.49 ab	17.85 a-e
Th-M23	20.67	80.56 abc	17.20 e
Th-01-52	14.11	86.73 abc	17.80 a-e
Bs-Endo 2(1)*	12.33	88.40 abc	18.20 a-e
Bs-M- Endo 2(1)	19.00	82.11 abc	18.20 a-e
Bs-Endo 2(2)*	7.11	93.31 a	17.60 cde
Bs-M- Endo 2(2)	7.00	93.42 a	18.00 a-e
Bs-Endo 2(3)*	23.67	77.74 bc	17.70 b-d
Bs-M- Endo 2(3)	15.78	85.16 abc	18.65 ab
Bs-Endo 3(1)*	27.33	74.30 c	17.90 a-e
Bs-M- Endo 3(1)	14.78	86.10 abc	18.00 a-e
Bs-BB165*	22.00	79.31 abc	18.15 a-e
Bs-M-BB165	21.00	80.25 abc	17.85 a-e
Bs-DGg13*	21.67	79.62 abc	17.80 a-e
Bs-M-DGg13	15.44	85.48 abc	17.40 de
CV. (%)	-	15.74	3.27

หมายเหตุ * สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)

[1/]เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคบนผลองุ่น = (R1 – R2)/ R1x 100

R1 คือ พื้นที่แผลบนผลองุ่น ในกรรมวิธีควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 (ต่อ)

R2 คือ พื้นที่แผลบนผลองุ่น กรรมวิธีทดสอบ

[2/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลขององุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลขององุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในสภาพแปลงปลูกระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2553

7.1 ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จากการตรวจปริมาณการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp ไอโซเลท BB 165 และ ไอโซเลท Endo 2(2) สามารถมีชีวิตรอดได้ดีในสภาพแปลง โดยสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^3-10^5 CFU/g ของใบและผิวผลองุ่น ในส่วนของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ สายพันธุ์ PM 9 พบว่าสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 10^1- 10^2 CFU/g ของใบและผิวผลองุ่น (ตารางที่ 10) สำหรับยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) ไม่พบการมีชีวิตรอดของเชื้อ แต่พบว่ามีเชื้อราชนิดอื่นเจริญบนอาหาร ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีขาว เหมือนกับกรรมวิธีควบคุมโดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราประจำถิ่นที่อยู่ตามใบขององุ่น (ภาพที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) บนใบ และผิวผลองุ่นหลังจากพ่นเชื้อครั้งที่ 1 ครบ 14 วัน หลังพ่นเชื้อครั้งที่ 2 ครบ 14 วัน และหลังพ่นเชื้อ ครั้งที่ 3 ครบ 4 วัน

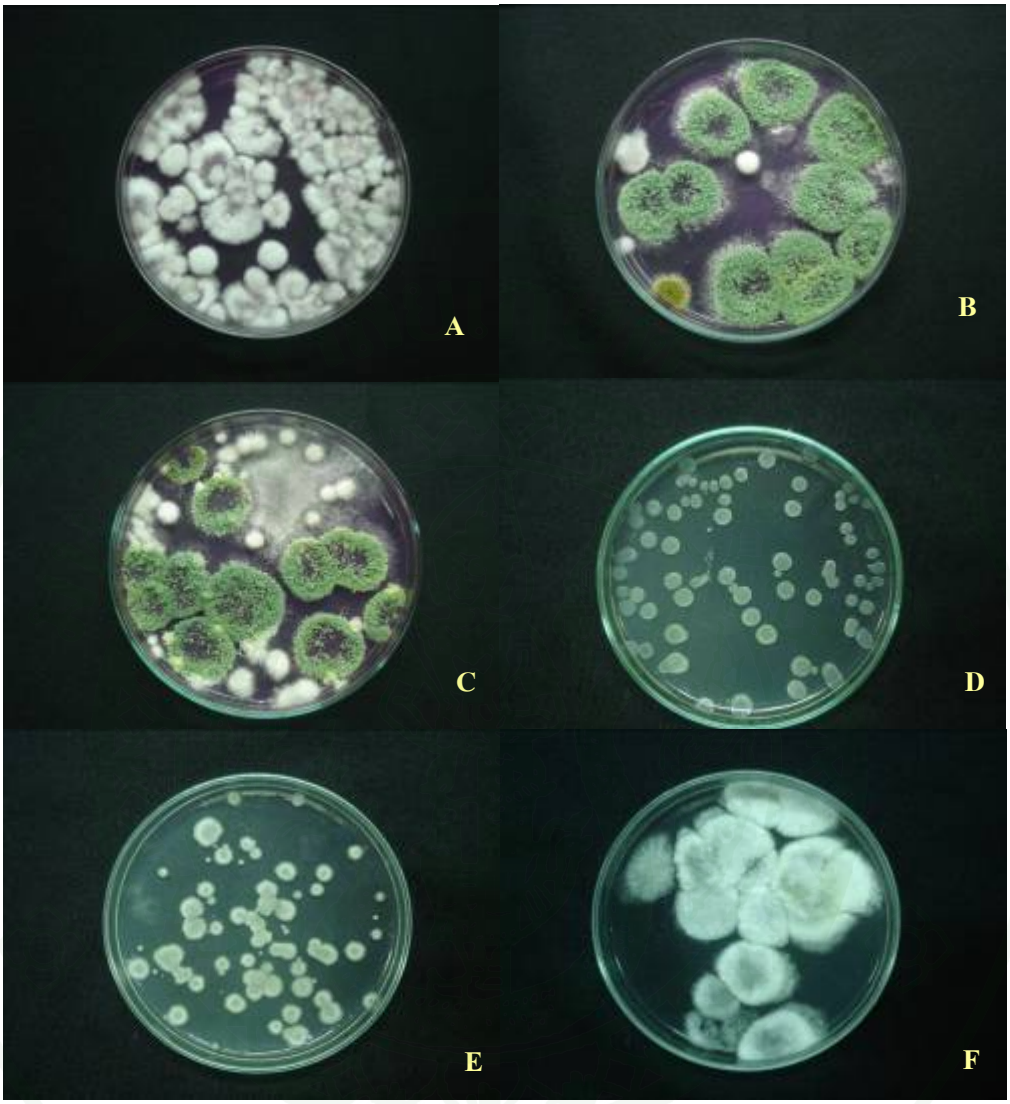
กรรมวิธี	ปริมาณเชื้อบนผิวผลองุ่น (10^2 CFU/g)			ปริมาณเชื้อบนใบขององุ่น (10^2 CFU/g)		
	ครั้งที่ 1[1/] (15/3/53)	ครั้งที่ 2[1/] (29/3/53)	ครั้งที่ 3[2/] (12/4/53)	ครั้งที่ 1 (15 /3/53)	ครั้งที่ 2 (29/3/53)	ครั้งที่ 3 (12/ 4/53)
Control	-	-	-	-	-	-
Th-CB-Pin-01	3.3 b [3/]	1.2 b	6.8 b	6.3 b	0.3 b	12.7 b
Th-PM 9	5.3 b	1.0 b	5.8 b	11.0 b	0.4 b	10.0 b
Bs-BB165	60.5 a	111.4 a	1,865.0 a	106.1 a	86.6 a	1,281.7 a
Bs-Endo2(2)	29.6 ab	105.8 a	2,188.3 a	16.7 b	105.1 a	1,009.2 a
Y-Epi 3(2)	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b

หมายเหตุ [1/] เช็คปริมาณเชื้อจุลินทรีย์หลังพ่น 14 วัน

[2/] เช็คปริมาณเชื้อจุลินทรีย์หลังพ่น 4 วัน

[3] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบอ่อนในกรรมวิธีต่างๆ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

A. กรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่เกษตรปฏิบัติโดยพ่นสารเคมี)

B. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

C. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9

D. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165

E. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

F. กรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.2 การประเมินอาการโรคบนช่อผลองุ่นก่อนเก็บเกี่ยว

การประเมินระดับอาการโรคบนช่อองุ่นก่อนการเก็บเกี่ยวในสวนของคุณบุญส่ง ธรรมรักษากุล ตั้งอยู่หมู่ที่ 8 ตำบลท่านัด อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี ทั้ง 6 กรรมวิธี คือ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ไอโซเลท Endo 2(2) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ไอโซเลท BB 165 และยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) สำหรับกรรมวิธีควบคุมนั้นใช้สารเคมีตามที่เกษตรกรปฏิบัติในแปลงองุ่น โดยพ่นสารเคมี แมนโคเซบ คาร์เบนดาซิม และสารเคมีฆ่าแมลง พบว่าทุกกรรมวิธีไม่พบอาการโรคแอนแทรค-โนสและโรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot; *Lasiodiplodia theobromae*) บนผลองุ่น แต่จะพบอาการโรคผลเน่า (Bitter rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Greeneria uvicola* โดยพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีระดับอาการเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ สำหรับกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) ตรวจไม่พบอาการของโรคผลเน่า (Bitter rot) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 11) นอกจากนี้แล้วยังพบอาการผลเน่าดำ (Black mold rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ระดับอาการโรคบนช่อผลองุ่นที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยการประเมินโรคก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต (16 เมษายน 2553)

กรรมวิธี	ระดับอาการโรค [1/]			
	Anthracnose	Bitter rot	Black mold rot	Lasiodiplodia rot
Control[2/]	0.00	0.20 a[3/]	0.15[ns]	0.00
Th-CB-Pin-01	0.00	0.20 a	0.10	0.00
Th-PM 9	0.00	0.00 b	0.05	0.00
Bs-BB165	0.00	0.10 ab	0.10	0.00
Bs-Endo2(2)	0.00	0.00 b	0.05	0.00
Y-Epi 3(2)	0.00	0.10 a	0.10	0.00
CV. (%)	-	24.73	26.39	-

หมายเหตุ [1/] ระดับการเกิดโรคบนช่อผล เป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการผลเน่า

ระดับ 1 แสดงอาการผลเน่า 1 หรือ 2 ผลในช่อ

ระดับ 2 แสดงอาการผลเน่าหนึ่งในสิบถึงหนึ่งในสี่ของผลทั้งหมดในช่อ

ระดับ 3 แสดงอาการผลเน่าหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่งของผลทั้งหมดในช่อ

ระดับ 4 แสดงอาการผลเน่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของผลทั้งหมดในช่อ

[2/] กรรมวิธีควบคุมเป็นวิธีการที่เกษตรกรพ่นสารเคมีตามปกติ โดยพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และสารเคมีฆ่าแมลง

[3/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

[ns] ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 12 ลักษณะช่อผลองุ่นในสภาพแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น ระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2553

A. กรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่เกษตรปฏิบัติโดยพ่นสารเคมี)
B. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01
C. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9
D. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165
E. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)
F. กรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.3 การประเมินอาการโรคบนช่อผลอ่อนหลังการเก็บเกี่ยว

หลังจากเก็บเกี่ยวช่ออ่อนแต่ละกรรมวิธีในแปลงมาวางในตะกร้า ทดสอบการเกิดโรคทั้งกรณีทำแผลและไม่ทำแผล โดยในกรณีทำแผลใช้เข็มทำแผลที่ผลอ่อน 5 ผลต่อช่อ หลังจากนั้นจึงพ่นเชื้อรา *C . gloeosporioides* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อช่อผล บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนผลที่แสดงอาการโรคพบว่าในส่วนที่ทำแผลมีการเกิดโรคโดยกรรมวิธีควบคุมมีขนาดแผลสูงสุด (ภาพที่ 13)ในส่วนที่ไม่ทำแผลไม่พบอาการโรคแอน-แทรคโนสแต่พบอาการโรคผลเน่า (Bitter rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *G. uvicola* และโรคผลเน่ากำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) (ตารางที่ 12 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนช่อผลอ่อนที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y)โดยการประเมินโรคหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน ในกรณีไม่ทำแผล

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/]		
	Anthracnose	Bitter rot	Lasiodiplodia rot
Control[2/]	0.00	10.18 a[3/]	0.00 b
Th-CB-Pin-01	0.00	1.18 b	0.00 b
Th-PM 9	0.00	0.00 b	0.83 b
Bs-BB165	0.00	0.00 b	1.56 b
Bs-Endo2(2)	0.00	0.00 b	1.77 b
Y-Epi 3(2)	0.00	0.00 b	6.68 a

หมายเหตุ [1/] เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคคำนวนโดย (จำนวนผลที่เป็นโรค/ จำนวนผลทั้งหมด) x 100

[2/] กรรมวิธีควบคุมเป็นวิธีการที่เกษตรกรพ่นสารเคมีตามปกติ โดยพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และสารเคมีฆ่าแมลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 (ต่อ)

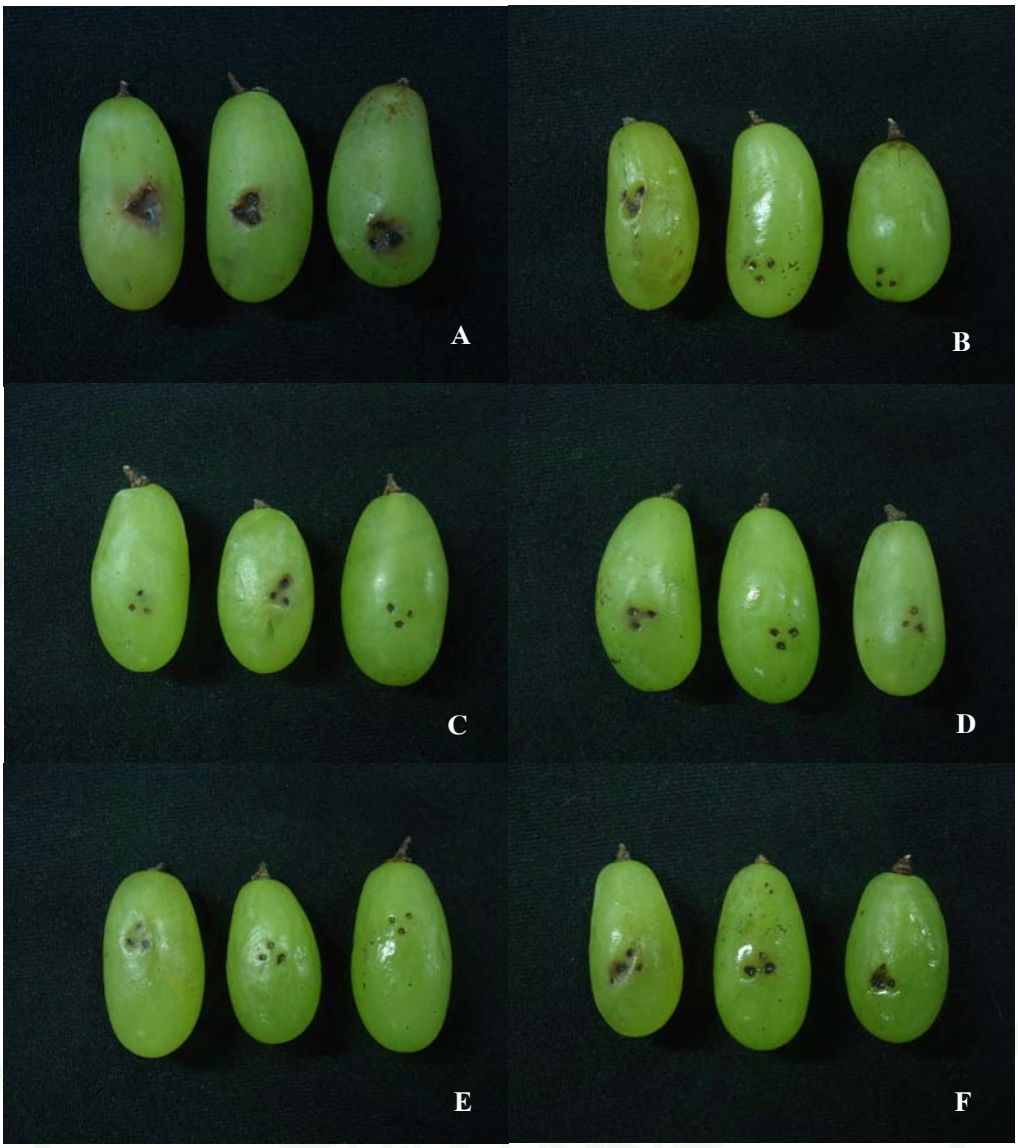
[3/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ภาพที่ 13 ลักษณะอาการของโรคหลังการเก็บเกี่ยว

A. โรคผลเน่ากำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot; *Lasiodiplodia theobromae*) (ลูกศรชี้)

B. โรคผลเน่า (Bitter rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Greeneria uvicola* (ลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ลักษณะผลองุ่นที่ปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* หลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน กรณีทำแผล

A. กรรมวิธีควบคุม (control)

B. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

C. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9

D. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

E. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165

F. กรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นในสภาพแปลงปลูกระหว่าง 29 พฤษภาคม - 8 กันยายน 2553

8.1 ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การตรวจปริมาณการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังพ่นครั้งที่ 1 (29 พฤษภาคม 2553) ถึงครั้งที่ 5 (22 กรกฎาคม 2553) โดยการกดกิ่งองุ่นที่ตัดเป็นท่อนๆ บน Martin's medium อาหาร NGA และอาหาร YMA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลท BB 165 และ ไอโซเลท Endo 2(2) สามารถครอบครองกิ่งองุ่นได้ดีในสภาพแปลงซึ่งไม่มีความแตกต่างกับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 (ตารางที่ 13) ในส่วนของยีสต์ปฏิปักษ์พบว่าไม่สามารถครอบครองกิ่งองุ่นได้ (ภาพที่ 15)

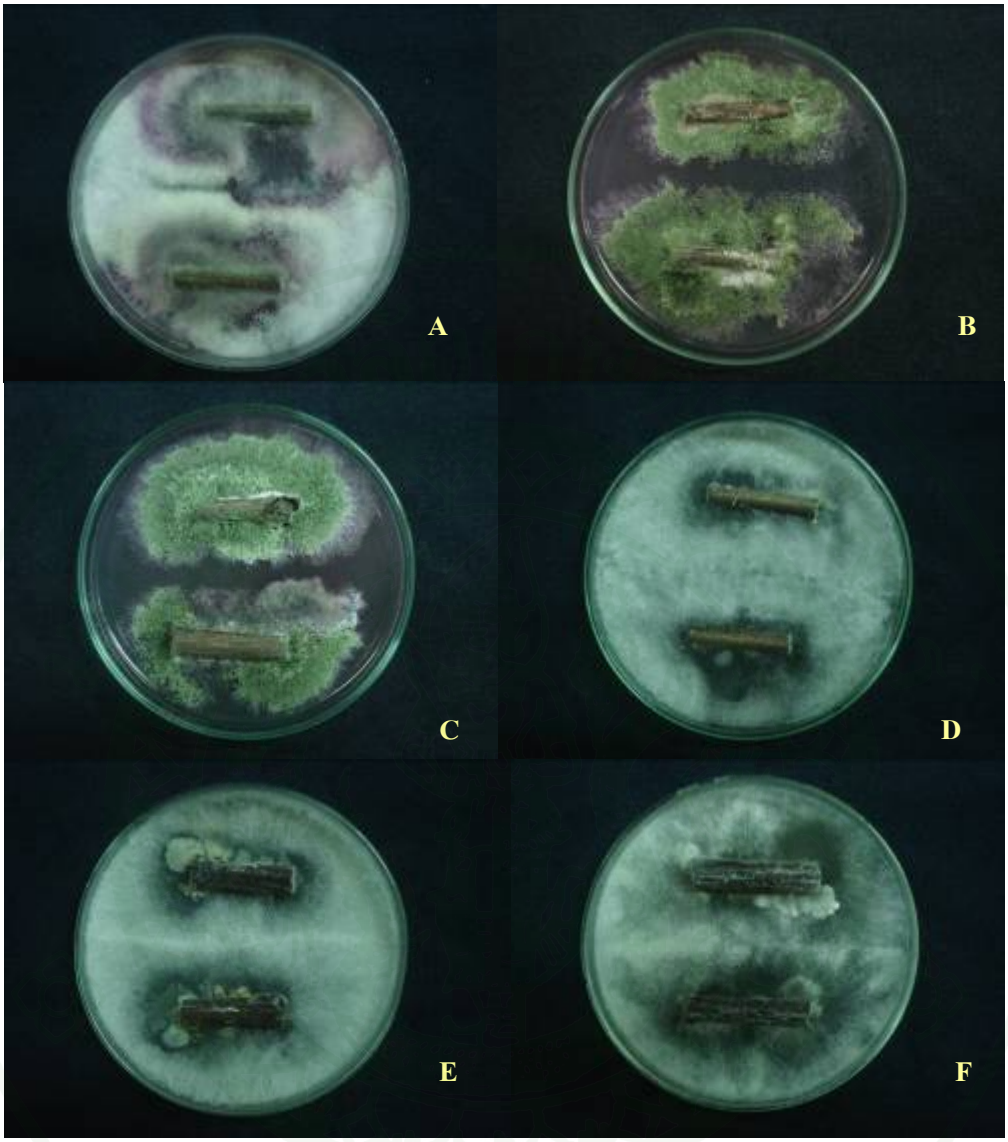
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การครอบครองกิ่งอ่อนของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) เมื่อตรวจเชื้อหลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 1(29 พ.ค.53) ถึงครั้งที่ 5 (22 ก.ค.53)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การครอบครองกิ่งอ่อน				
	ครั้งที่ 1 (2 /5/53)	ครั้งที่ 2 (11/6/53)	ครั้งที่ 3 (25/6/53)	ครั้งที่ 4 (9 /7/53)	ครั้งที่ 5 (22/7/53)
Control	-	-	-	-	-
Th-CB-Pin-01	81.3 ab[1/]	84.4 a	67.5 a	82.5 a	90.0 a
Th-PM 9	50.0 b	84.4 a	70.0 a	87.5 a	90.0 a
Bs-BB165	50.0 b	87.5 a	67.5 a	95.0 a	95.0 a
Bs-Endo2(2)	87.0 a	93.8 a	75.0 a	100.0 a	100.0 a
Y-Epi 3(2)	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
CV. (%)	37.9	17.6	17.6	18.3	11.4

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์จากกิ่งอุ่นในกรรมวิธีต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

A. กรรมวิธีควบคุม (control)

B. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

C. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9

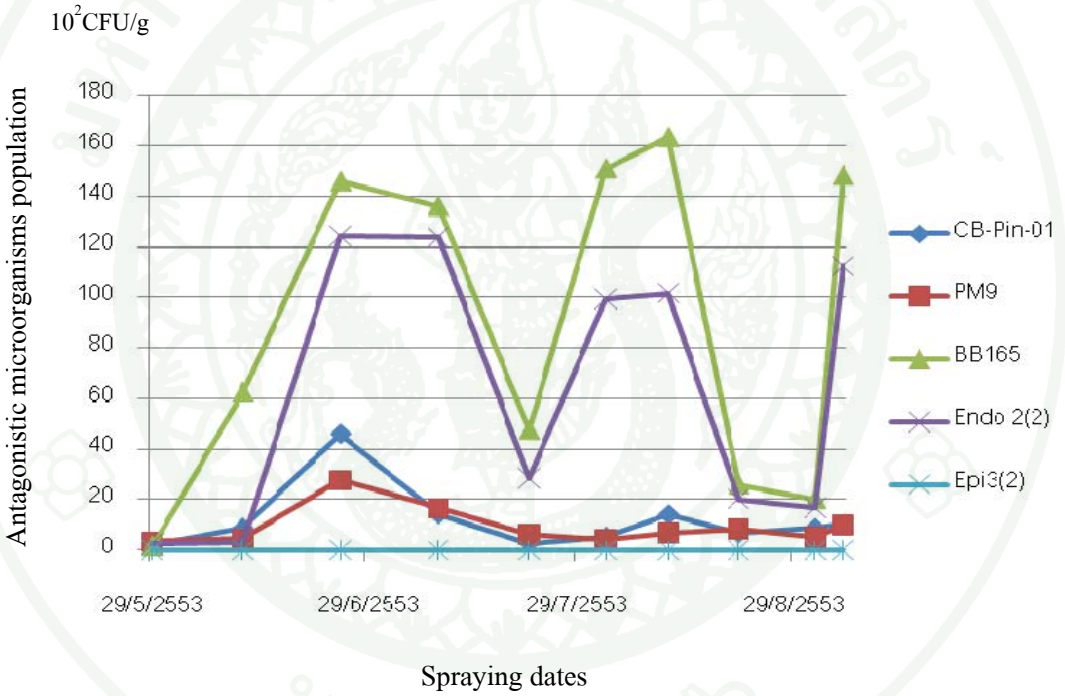
D. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165

E. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

F. กรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจปริมาณการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบองุ่นหลังพ่นครั้งที่ 1 ถึง ครั้งที่ 10 โดยตรวจด้วยอาหาร Martin' s medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* อาหาร NGA สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และอาหาร YMA สำหรับเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ พบว่าทั้งเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ สายพันธุ์ PM9 สามารถมีชีวิตรอดอยู่บริเวณใบขององุ่นได้ โดยปริมาณเชื้อรามีจำนวนเพิ่มขึ้นแล้วลดลงดังภาพที่ 16 ในส่วนของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ไอโซเลท BB 165 และไอโซเลท Endo 2(2) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมีความสามารถในการมีชีวิตรอดได้ดีกว่าเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นและลดลง สำหรับเชื้อยีสต์พบว่าไม่สามารถอยู่รอดบนใบองุ่นในสภาพแปลงทดลองได้



ภาพที่ 16 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01, PM9) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (BB165, Endo 2(2)) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Epi3(2)) บนใบองุ่นหลังจากพ่นเชื้อครั้งที่ 1 (29 พฤษภาคม 2553) จนถึงครั้งที่ 10 (5 ก.ย. 2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2 การประเมินอาการโรคบนช่อผลองุ่นก่อนเก็บเกี่ยว

การประเมินระดับอาการโรคบนช่อองุ่นก่อนการเก็บเกี่ยวในครั้งที่ 2 ในสวนของคุณบุญส่ง ธรรมรักษากุล จังหวัดราชบุรี ทั้ง 6 กรรมวิธี คือ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ไอโซเลท Endo 2(2) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.โซเลท BB 165 และยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) สำหรับกรรมวิธีควบคุมนั้นใช้สารเคมีตามที่เกษตรกรปฏิบัติในแปลงองุ่น โดยพ่นสารเคมีแมนโคเซบ คาร์เบนดาซิม และสารเคมีฆ่าแมลง จากการประเมินอาการโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) โรคผลเน่า (Bitter rot) และโรคผลเน่าดำ (Black mold rot; *Aspergillus niger*) (ภาพที่ 17) บนผลองุ่น พบว่า พบโรคผลเน่าและโรคผลเน่าดำในทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบ ขณะที่โรคแอนแทรคโนสและโรคผลเนาดำกำมะหยี่พบในบางกรรมวิธี โดยระดับอาการของโรคทุกโรคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 14)

ภาพที่ 17 ลักษณะอาการของโรคผลเน่าดำ (Black mold rot; *Aspergillus niger*) และลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus niger*
A.ลักษณะอาการของโรคผลเน่าดำ
B.ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. niger*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ระดับอาการโรคบนช่อผลองุ่นหลังจากพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยประเมินผลก่อนเก็บเกี่ยว

กรรมวิธี	ระดับอาการโรค [1/]			
	Anthracnose	Bitter rot	Black mold rot	Lasiodiplodia rot
Control	0.15 [ns]	0.35 [ns]	0.20 [ns]	0.15 [ns]
Th-CB-Pin-01	0.10	0.20	0.25	0.15
Th-PM 9	0.00	0.45	0.05	0.10
Bs-BB165	0.10	0.35	0.35	0.10
Bs-Endo2(2)	0.00	0.12	0.05	0.10
Y-Epi 3(2)	0.00	0.25	0.05	0.00
CV. (%)	28.19	42.89	37.13	30.15

หมายเหตุ [1/] ระดับการเกิดโรคบนช่อผล เป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการผลเน่า

ระดับ 1 แสดงอาการผลเน่า 1 หรือ 2 ผลในช่อ

ระดับ 2 แสดงอาการผลเน่าหนึ่งในสิบถึงหนึ่งในสี่ของผลทั้งหมดในช่อ

ระดับ 3 แสดงอาการผลเน่าหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่งของผลทั้งหมดในช่อ

ระดับ 4 แสดงอาการผลเน่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของผลทั้งหมดในช่อ

[ns] ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 18 ลักษณะช่อผลองุ่นในสภาพแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยวเพื่อศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่นหลังการเก็บเกี่ยว ระหว่าง 29 พฤษภาคม - 8 กันยายน 2553

A. กรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่เกษตรปฏิบัติโดยพ่นสารเคมี)
B. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01
C. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9
D. กรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2)
E. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165
F. กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อทำการประเมินโรคแล้วจึงนำช่อผลองุ่นมาวัดขนาดของช่อ ขนาดของผล และชั่งน้ำหนัก พบว่าทุกกรรมที่ศึกษามีขนาดผลและขนาดช่อไม่แตกต่างกัน แต่น้ำหนักช่อมีความแตกต่างกัน โดยทุกกรรมวิธีที่พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนผลช่วยให้น้ำหนักผลในช่อมีค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาทั้งสองสายพันธุ์ ช่วยให้น้ำหนักผลต่อช่อเพิ่มขึ้นขึ้น 26.11-28.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การสุ่มผลองุ่นจากกลางช่อมา 5 ผลต่อช่อ จำนวน 25 ผลต่อซ้ำ นำมาคั้นน้ำ วัดค่าเปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) โดยใช้ Hand Refractrometer พบว่ากรรมวิธีที่ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซ-เลท Endo 2(2) มีความหวานมากที่สุดโดยมีค่า TSS ที่ 16.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 8.61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าสัดส่วน TSS/TA สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย จากค่าความหวานขององุ่นที่วัดได้พบว่ามีความหวานน้อยกว่าระดับความหวานปกติขององุ่นโดยทั่วไปทั้งนี้ เนื่องจากมีความจำเป็นต้องเก็บเกี่ยวผลผลิตก่อนครบอายุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 อิทธิพลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) ต่อขนาดช่อ ขนาดผล และน้ำหนักขององุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

กรรมวิธี	ขนาดช่อ			ขนาดผล		
	กว้าง (cm)	ยาว (cm)	น้ำหนัก (กรัม/ช่อ)	กว้าง (cm)	ยาว (cm)	น้ำหนัก (กรัม/ผล)
Control	7.53 ns	11.53 ns	113.0b 1/	1.59 ns	2.92 ns	4.44 ns
Th-CB-Pin-01	7.87	12.40	145.25 a	1.61	2.94	4.54
Th-PM9	7.88	12.33	142.50 a	1.57	2.87	4.37
Bs-BB 165	7.37	11.68	128.75 ab	1.57	2.81	4.37
Bs-Endo 2(2)	7.66	12.49	130.50 ab	1.54	2.93	4.37
Y-Epi 3(2)	7.53	11.81	135.50 ab	1.60	2.82	4.29
CV. (%)	11.63	15.19	28.67	2.83	4.11	5.24

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 อิทธิพลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) ต่อเปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) และเปอร์เซ็นต์ tritratable acidity (TA) ขององุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

กรรมวิธี	TSS (%)	TA (%)	สัดส่วนTSS/TA
Control	15.33 c[1/]	0.98 [ns]	15.68 b
Th-CB-Pin-01	15.85 b	0.99	16.04 b
Th-PM9	15.80 bc	1.00	15.84 b
Bs-BB 165	15.99 b	0.99	16.09 b
Bs-Endo 2(2)	16.65 a	0.93	18.04 a
Y-Epi 3(2)	16.24 ab	0.94	17.58 a
CV. (%)	3.72	6.52	8.36

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

[ns] ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

8.3 การประเมินอาการโรคบนช่อผลองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว

หลังจากเก็บเกี่ยวช่อองุ่นในสภาพแปลงของแต่ละกรรมวิธีมาวางในตะกร้า บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนผลที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่าจากเชื้อรา *Greeneria uvicola* (Bitter rot) และโรคอื่นๆ นับจำนวนผลทั้งหมดของช่อจากนั้นนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของช่อองุ่น จากผลการศึกษาพบว่าโรคในช่อองุ่นหลังการเก็บเกี่ยวที่พบมากที่สุดคือ โรค Bitter rot โดยในกรรมวิธีควบคุมที่เกษตรกรใช้สารเคมี พบโรค 26.30 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีที่พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีเปอร์เซ็นต์เกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยสุด ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม 24.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโรคแอนแทรคโนสซึ่งเป็นโรคเป้าหมายที่ต้องการศึกษา พบว่ากรรมวิธีควบคุมมีการเกิดโรคมากที่สุด 3.89 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 เชื้อแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacillus sp. ไอโซเลท BB 165 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) พบว่าเกิดโรคเพียง 1.11-1.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับกรรมวิธีที่พ่นด้วย เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) และ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 ที่ไม่พบอาการโรคแอนแทรคโนสของอุ่นเลย (ตารางที่ 17) ส่วนโรคอื่นที่พบบนผลอุ่นหลังจากการเก็บเกี่ยวคือโรคโรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) โดยพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่าดำกำมะหยี่ มากสุด 8.17 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 4.25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วย เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่าดำกำมะหยี่น้อยสุดเพียง 1.67 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคช่อผลองุ่นที่พ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Th) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (Bs) และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ (Y) โดยการประเมินโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/] (%)		
	Anthracnose	Bitter rot	Lasiodiplodia rot
Control[2/]	3.89 a[3/]	26.30 a	4.25 ab
Th-CB-Pin-01	1.15 b	6.08 bc	1.67 b
Th-PM 9	0.00 b	4.89 bc	3.19 ab
Bs-BB165	1.11 b	4.53 bc	3.61 ab
Bs-Endo2(2)	0.00 b	2.05 c	2.22 ab
Y-Epi 3(2)	1.75 ab	17.61 ab	8.17 a

หมายเหตุ [1/] เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคคำนวณโดย (จำนวนผลที่เป็นโรค/ จำนวนผลทั้งหมด) x 100

[2/] กรรมวิธีควบคุมเป็นวิธีการที่เกษตรกรพ่นสารเคมีตามปกติ โดยพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และสารเคมีฆ่าแมลง

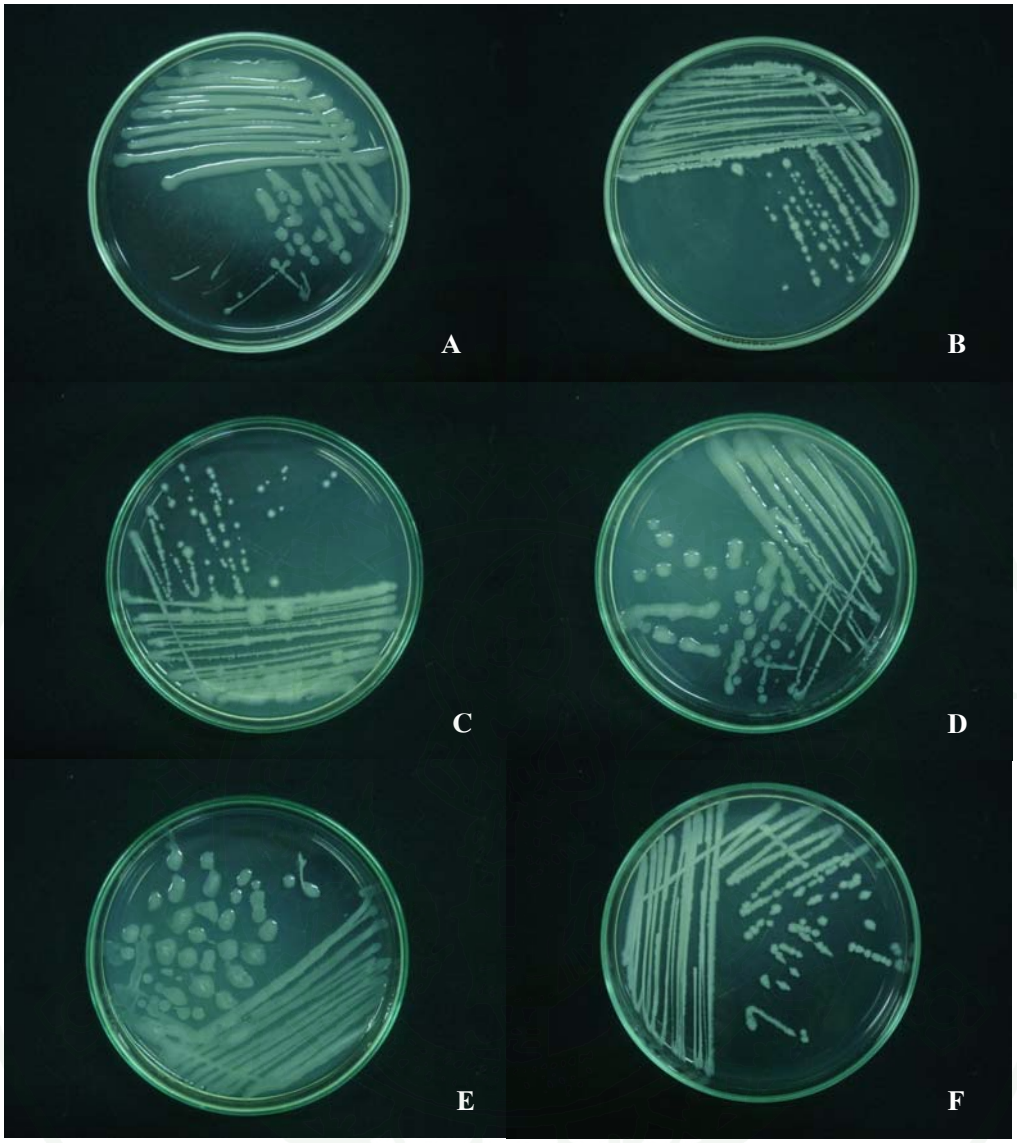
[3/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's multiple range test (P=0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยการทดสอบแกรมโดยใช้ 3% KOH และการย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือก ทั้ง 6 ไอโซเลท (ภาพที่ 19) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Microflex MALDI-TOF และโปรแกรม MALDI-Biotyper ซึ่งเป็นเครื่องมือที่วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละเปปไทด์ที่อยู่ในโปรตีนตัวอย่างได้ นำไปสู่การค้นหาโดยเทียบกับสายเปปไทด์ในฐานข้อมูล เพื่อระบุชนิดของโปรตีน วิธีการนี้ได้รับการพัฒนาให้มีวิธีการ และระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว ผลจากการจำแนกพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(1) มีความใกล้เคียงกับเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(3) มีความใกล้เคียงกับเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท DGg 13 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 3(1) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165 ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบที่ streak บนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(1)

B. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2)

C. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(3)

D. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 3(1)

E. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165

F. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท DGg 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสขององุ่น และการแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากใบองุ่นและผลที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส พบว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งมีลักษณะของเส้นใยสีเทา ฟู สร้าง spore mass สีส้มเมื่อเชื้อรามีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ ลักษณะ spore มีลักษณะรูปไข่ หัวท้ายมน มีเซลล์เดียว สี hyaline ไม่มี septum ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fukaya (1999) และ วิไลรัตน์ (2546) ที่รายงานว่าโรคแอนแทรคโนสขององุ่นเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides*

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบองุ่นมีทั้งหมด 90 ไอโซเลท พบว่าวิธีการพิมพ์ใบองุ่นที่เป็นโรคโดยตรง (Diseased leaf printing; DLP) และการแยกเชื้อบนผิวใบองุ่น สามารถแยกเชื้อราบนผิวใบ (Epiphyte; Epi) ได้ในจำนวนเท่าเทียมกัน (11 ไอโซเลท) วิธีล้างผิวชิ้นใบองุ่นสามารถแยกยีสต์บนผิวใบได้ (7 ไอโซเลท) ในขณะที่วิธีฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นใบองุ่นด้วย 0.525% sodium hypochlorite สามารถแยกแบคทีเรียใต้ผิวใบ (Endophyte; Endo) ได้ถึง 11 ไอโซเลท ขณะที่การพิมพ์ใบองุ่นแยกเชื้อแบคทีเรียไม่ได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ตามผิวใบองุ่น สูญเสียความมีชีวิตง่าย หรือเซลล์แบคทีเรียเกาะติดแน่นอยู่กับผิวใบและบางส่วนฝังตัวอยู่ใต้ผิวใบ ทำให้การแยกโดยพิมพ์ใบนั้น ใบองุ่นไม่สัมผัสกับอาหารที่ใช้แยกอย่างทั่วถึง ในขณะที่การแยกเชื้อโดยการล้างผิวใบนั้น จุลินทรีย์รวมทั้งแบคทีเรีย และยีสต์จะออกมาอยู่ในน้ำล้างผิวใบได้ง่ายกว่า จึงทำให้การแยกด้วยการล้างผิวชิ้นใบองุ่นเป็นวิธีที่แยกจุลินทรีย์ได้มากที่สุด และการที่แยกยีสต์ได้น้อย อาจเนื่องมาจากตอนที่แยกเชื้อไม่ได้แยกด้วยอาหารจำเพาะของยีสต์

ได้คัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีจำนวน 47 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น เชื้อรา 24 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท และยีสต์ 8 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อราทดสอบที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแตกต่างกันไปซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราทดสอบต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ 4 แบบ แบบที่ 1 เชื้อราทดสอบสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ซึ่งมีเพียงไอโซเลทเดียว คือ ไอโซเลท DLP1-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 56.40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีการคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จุลินทรีย์รูปแบบที่ 1 คาดว่าน่าจะเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดี แบบที่ 2 เชื้อราทดสอบเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* แต่ไม่พบการเจริญคลุมทับ เช่น ไอโซเลท DLP1-5 DLP8-3 ซึ่งจำแนกเบื้องต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ว่าเป็นเชื้อรา *Nigrospora* sp. โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 65.60 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อรารูปแบบที่ 2 เป็นรูปแบบของเชื้อราที่สามารถไปแข่งขันแย่งพื้นที่ หรือครอบครองผิวผล ใบ และกิ่งอ่อนได้ดี และหาอาหารได้ดี ซึ่งตรงกับกลไกของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในเรื่องของการแข่งขัน แบบที่ 3 เชื้อราทดสอบเจริญมาชนกับเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เพียงเล็กน้อยขึ้น โดยเกิดเป็นรอยสีเขียวตรงบริเวณที่เชื้อราเจริญมาชนกัน เช่น ไอโซเลท Epi6-1 Epi8-1 ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 43.00 และ 56.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบบที่ 4 เชื้อราทดสอบสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เกิดเป็นบริเวณ clear zone มีเพียงไอโซเลทเดียว คือ ไอโซเลท Epi 3-2 โดยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 45.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งรูปแบบที่ 4 เป็นรูปแบบที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และจากการจำแนกเชื้อราไอโซเลท Epi 3-2 สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Fusarium* sp. เชื้อราไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือไอโซเลท DLP 1-5 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 65.60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรัศมีการเจริญของโคโลนีเฉลี่ย 3.77 เซนติเมตร และมีรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์เป็นแบบที่ 2 ซึ่งสามารถแข่งขันแย่งพื้นที่ต่อเชื้อรา เชื้อราทดสอบสามารถแข่งขันในการใช้อาหารเพื่อเจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เชื้อราทดสอบเจริญได้รวดเร็วกว่า จากการจำแนกชนิดของเชื้อพบว่าเชื้อราทดสอบนี้เป็นเชื้อรา *Nigrospora* sp. สำหรับไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพรองลงมา คือ ไอโซเลท Epi 6-2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 60.27 เปอร์เซ็นต์ มีรัศมีการเจริญของโคโลนีเฉลี่ย 3.30 เซนติเมตรและมีรูปแบบการเจริญเป็นปฏิปักษ์เป็นแบบที่ 3 ซึ่งเป็นรูปแบบส่วนใหญ่ของเชื้อราที่มีความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคที่พบในการทดลองครั้งนี้ ส่วนไอโซเลท DLP 1-2 เป็นเชื้อราทดสอบเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถเจริญคลุมทับเชื้อราสาเหตุโรคได้นั้น แม้ว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียง 56.40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่ก็ควรคัดเลือกไว้ศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากความสามารถที่จะเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้นั้น เป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของการเป็นเชื้อราปรสิต ที่สามารถเข้าทำลายส่วนมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรคได้ เช่นเดียวกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีรายงานมากมายว่า เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดโรคพืช และสามารถเจริญเข้าคลุมทับ พันรัด และทำลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ ได้ดี (Harman, 2004 ; จิระเดช, 2549)

สำหรับยีสต์พบว่ายีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดยยีสต์ไอโซเลท Epi 5(2) และ Epi 3(2) เจริญได้เร็วแม้ว่าจะไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระยะแรก แต่ในระยะต่อมา เมื่อยีสต์สัมผัสกับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว ยีสต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถเจริญลามเข้ามายังเส้นใย แล้วทำให้บริเวณเส้นใยเชื้อราที่สัมผัสกับยีสต์ยุบตัวลงได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 51.00 และ 50.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Droby *et al.* (1989) และ Spadaro *et al.* (2002) ที่รายงานว่า กลไกของการเป็นยีสต์ปฏิปักษ์โดยส่วนใหญ่เป็นแบบเจริญรวดเร็ว แข่งขันทางด้านที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร ซึ่งยีสต์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ในส่วนของแบคทีเรียพบว่าส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยมีการเกิด clear zone ส่งผลให้เชื้อ *C. gloeosporioides* หยุดการเจริญหรือเจริญได้ช้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวราภรณ์ (2550) และWhipps (1987) เกี่ยวกับประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะสารออกมายับยั้งทำให้เกิด clear zone มีผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเจริญได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญได้ ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(2) และ Endo 3(1) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 55.67 และ 54.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ดีมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคบนผลองุ่นทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อรา 5 ไอโซเลท แบคทีเรีย 4 ไอโซเลท และยีสต์ 1 ไอโซเลท พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทสามารถควบคุมโรคบนผลองุ่นได้ โดยมีพื้นที่แผลบนผลองุ่นน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบว่า เชื้อราไอโซเลท DLP 8-3 Epi 3-2 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(2) และยีสต์ไอโซเลท Epi 3(2) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถลดการเกิดโรคบนผลองุ่นได้ถึง 86.90 74.60 86.90 และ 78.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากผลองุ่นสอดคล้องกับรายงานของ Korseten *et al.* (1995) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบและผลของอะโวกาโด มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* *Phomopsis perseae* และ *Fusarium solani* ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรค เนื่องจากการสร้างสารปฏิชีวนะในปริมาณมาก และจากรายงานของ จิรัสสา (2547) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากผลพริก 4 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเกิดแผลของโรคแอนแทรคโนสในพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* โดยสามารถลดขนาดแผลลงได้ 53.05-81.31 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ด้วยวิธี dual culture test พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ทุกสายพันธุ์มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยสายพันธุ์ PM9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด โดยเชื้อรา *T. harzianum* ทุกสายพันธุ์ มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลไกในการแข่งขันการใช้อาหาร และครอบครองพื้นผิวของผลที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืช ไม่สามารถเจริญในบริเวณที่มีเชื้อรา *T. harzianum* (จิระเดช, 2549) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ BB165, Endo2(1), Endo2(2), Endo2(3) และ Endo3(1) ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิด clear zone ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวราภรณ์ (2550)

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* อีกครั้งพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท Endo 2(1) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย ไอโซเลท Endo 2(1) เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท Endo 2(2) สายพันธุ์ดั้งเดิม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างกันกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธ์กลาย M3-Endo 2(2), M4-Endo 2(2) และ M5-Endo 2(2) แต่กลับพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคลดลง(ความกว้างบริเวณยับยั้งลดลง) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท Endo 2(3), Endo 3(1), BB165 และ DGg 13 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นิชากร (2553) ที่พบว่า การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Helminthopsorium oryzae Trichoconis padwickii* และ *Curvularia lunata* ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อแบคทีเรียบางไอโซเลทลดลง บางไอโซเลทเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* และ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่น พบว่าจุลินทรีย์ที่ศึกษามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ โดยช่วยลดขนาดของแผลได้ 80.56-90.49 และ 74.30-93.42 % ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp สายพันธุ์ดั้งเดิม ไอโซเลท Endo 2(2) และสายพันธุ์กลาย ไอโซเลท M-Endo 2(2) มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการตรวจปริมาณการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp ไอโซเลท BB 165 และ ไอโซเลท Endo 2(2) สามารถมีชีวิตรอดได้ดีในสภาพแปลง โดยสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่บนใบและผิวผลองุ่น ในส่วนของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ สายพันธุ์ PM 9 พบว่าสามารถมีชีวิตอยู่บนใบและผิวผลองุ่นได้ สำหรับยีสต์ ไอโซเลท Epi 3(2) ไม่พบการมีชีวิตรอดของเชื้อ ทั้งนี้ตรวจเช็ดพบว่ามีเชื้อราชนิดอื่นเจริญบนอาหาร มีลักษณะโคโลนีสีขาว เหมือนกับกรรมวิธีควบคุมโดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราประจำถิ่นที่อยู่ตามใบขององุ่น

การประเมินระดับอาการโรคบนช่อองุ่นก่อนการเก็บเกี่ยวในสวนองุ่น ครั้งที่1 พบว่าทุกกรรมวิธีไม่พบอาการโรคแอนแทรคโนสและโรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) บนผลองุ่น แต่จะพบอาการโรคผลเน่า (Bitter rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *G. uvicola* โดยพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีระดับอาการเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ สำหรับกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ PM 9 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ไอโซเลท Endo 2(2) ตรวจไม่พบอาการของโรค Bitter rot เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี นอกจากนี้แล้วยังพบอาการผลเน่าดำ (Black mold rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *A. niger* ซึ่งแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองครั้งนี้ทำในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน ซึ่งเป็นช่วงที่อากาศร้อนมากทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมในการเกิดโรคแอนแทรคโนส นอกจากเหตุผลทางสภาพอากาศยังมีเหตุผลดังนี้ คือ แปลงองุ่นที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นแปลงใหม่ ต้นองุ่นมีอายุ 9 เดือน ถึงว่าเป็นการเก็บเกี่ยวผลผลิตในรอบแรกของเกษตรกรทำให้ไม่มีแหล่งสะสมเชื้อโรคแอนแทรคโนส และเกษตรกรชาวสวนองุ่นได้ใช้สารเคมีในการควบคุมโรคองุ่นร่วมด้วย แต่จากผลแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษามีความทนต่อสารเคมีได้ แม้จะมีการพ่นสารเคมีแต่ก็ยังพบการเจริญครอบครองตามกิ่ง ใบ และผลขององุ่น ซึ่งคิดว่าเป็นแนวทางที่ดีที่จะใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารเคมี และค่อยๆ ลดสารเคมีให้น้อยลง

สำหรับโรคหลังการเก็บเกี่ยวขององุ่นพบว่าเมื่อนำช่อองุ่นมาวางในตะกร้าทิ้งไว้ 7 วันจะพบอาการของโรคผลเน่า (Bitter rot) มากสุดเนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคได้ติดมากับช่อผลขององุ่น และพบว่าการท แผลและพ่นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในส่วนกรรมวิธีควบคุมมีการเกิดโรคมากสุด ส่วนกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีขนาดแผลของผลน้อยมาก

การประเมินระดับอาการโรคบนช่อองุ่นก่อนการเก็บเกี่ยวในครั้งที่ 2 ในสวนองุ่น จากการประเมินอาการโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) โรคผลเน่า (Bitter

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

rot) และโรคผลเน่าดำ (Black mold rot; *Aspergillus niger*) บนผลองุ่น พบว่า พบโรคผลเน่าและโรคผลเน่าดำในทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบขณะที่โรคแอนแทรคโนสและโรคผลเนาดำกำมะหยี่พบในบางกรรมวิธี โดยระดับอาการของโรคทุกโรคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาขนาดผลและขนาดช่อขององุ่นพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่น้ำหนักช่อมีความแตกต่างกัน โดยทุกกรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนผลช่วยให้น้ำหนักผลในช่อมีค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาทั้งสองสายพันธุ์ ช่วยให้น้ำหนักผลต่อช่อเพิ่มขึ้นขึ้น 26.11-28.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การสุ่มผลองุ่นจากกลางช่อมา 5 ผลต่อช่อ จำนวน 5 ช่อต่อซ้ำ นำมาคั้นน้ำ วัดค่าเปอร์เซ็นต์ total soluble solids (TSS) โดยใช้ Hand Refractrometer พบว่ากรรมวิธีที่ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) มีความหวานมากที่สุดโดยมีค่า TSS ที่ 16.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 8.61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าสัดส่วน TSS/TA สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อีกด้วย จากความหวานขององุ่นที่วัดได้พบว่ามีความหวานน้อยกว่าที่ควรจะเป็นเนื่องจากเก็บเกี่ยวผลผลิตก่อนเวลาครบอายุการเก็บเกี่ยว ซึ่งโดยปกติแล้วในการเก็บเกี่ยวผลผลิตขององุ่นจะนับวันตัดแต่งกิ่งจนถึงเก็บเกี่ยวจะใช้เวลา 110 -120 วัน แต่ขณะที่ทำการทดลองอยู่ในช่วงฤดูฝน ซึ่งถ้าฝนตกหนักและปริมาณมากจะทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายจึงจำเป็นต้องเก็บเกี่ยวผลผลิตก่อนเวลาที่กำหนด โดยเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังจากตัดแต่งกิ่งแล้ว 102 วัน ทั้งนี้ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตนั้นจะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมและความสุกแก่ของผลองุ่น และการตัดสินใจของเจ้าของสวนองุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จุลินทรีย์จากใบอุ่นที่เป็นเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ 25.33-65.60 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อราทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค มีรูปแบบการเจริญทั้งหมด 4 แบบ ส่วนใหญ่ที่พบเป็นรูปแบบที่ 3 (เชื้อเจริญพบกัน) เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่แยกได้เกือบทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งไอโซเลท Endo 2(2) และ Endo 3(1) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 55.67 และ 54.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงบางไอโซเลทเท่านั้น โดยเชื้อราทดสอบไอโซเลท DLP 8-3 และ Epi 3-2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบไอโซเลท Endo 2(2) และเชื้อยีสต์ทดสอบไอโซเลท Epi 3(2) สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลอุ่นได้ 86.90 74.60 86.90 และ 78.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้จากใบอุ่นและที่มีอยู่เดิมในห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของอุ่นได้ โดยทุกสายพันธุ์ ยกเว้น M23 สามารถเจริญคลุมทับเชื้อราสาเหตุโรคได้ ในส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลท พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ได้แก่ BB165, Endo2(1), Endo2(2), Endo2(3) และ Endo3(1) ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone)

การพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความต้านทานต่อ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และยังส่งผลต่อการสร้างสารยับยั้งน้อยลงด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) 6 ไอโซเลท และแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคบนผลอ่อน 74.30-93.42 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โซเลท Endo 2(2) wild type และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.สายพันธุ์กลาย Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้สูง

การทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของอ่อนในสภาพแปลงปลูกระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2553 นั้นตรวจพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ไอโซเลท Endo 2(2) บนใบและผลอ่อนมากที่สุด โดยทั้ง 6 กรรมวิธีที่ศึกษาสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนส โรคผลเน่าดำกำมะหยี่ (Lasiodiplodia rot) โรคผลเน่าดำ (Black mold rot) และโรคผลเน่า (Bitter rot) ได้เท่าเทียมกับกรรมวิธีควบคุมที่เกษตรกรใช้สารเคมี

สำหรับการทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของอ่อนในสภาพแปลงปลูกระหว่างเดือนพฤษภาคม - กันยายน 2553 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท Endo 2(2) มีประสิทธิภาพในการครอบครองกิ่งอ่อนได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB 165 ตรวจพบปริมาณเชื้อบนใบอ่อนมากที่สุด แต่ไม่พบอาการโรคของอ่อนในภาพแปลง

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองในสภาพแปลงนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาแปลงปลูกอ่อนที่สามารถควบคุมการให้น้ำ การใช้สารเคมีควบคุมเชื้อราด้วยตนเอง ทั้งนี้เพราะในสภาพภาพแปลงของเกษตรกรโดยทั่วไปมีการใช้สารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ระบบการปลูกอ่อนเป็นแบบท้องร่อง จึงอาจมีโอกาสปนเปื้อนสารเคมีได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้ไม่สามารถใช้แปลงปลูกอ่อนที่ปลอดสารเคมี เป็นกรรมวิธีควบคุมได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ควรพ่นเชื้อราหรือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทุกๆ 7 วัน เพื่อให้เชื้อไตรโคเดอร์มา หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถครอบครองส่วนต่างๆ ของพืชได้โดยเริ่มพ่นตั้งแต่หลังการตัดแต่งกิ่งอ่อน จนถึงระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิต หรือ อาจจะใช้สารเคมีในช่วงแรก แล้วเริ่มพ่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากที่ติดช่อผลแล้วเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายผลของอ่อนและช่วยให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มเกษตรสัญจร. ม.ป.ป. **การปลูกองุ่น.** สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ. 78 น.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. **การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช: โครงการเกษตรกู้ชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 90 น.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. **การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 323 น.

จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2547. **การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ชลอ ชำนาญพิทักษ์. 2539. **โรคไม้ผลและการป้องกันกำจัด.** อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 96 น.

ชมพูนุท บุญราชแขวง. 2550. **อิทธิพลของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ถิรัตถ์ สมารักษ์ และเกษม สร้อยทอง. 2545. **การใช้จุลินทรีย์คีโตเมี่ยมควบคุมโรคแอนแทรคโนสของปาล์มโดยชีววิธี.** หน้า19-20. ในรายงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3 วันที่ 18-19 กรกฎาคม 2545. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

นิชากร แซ่ตั้ง. 2553. **การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและลดโรคเมล็ดด่างของข้าว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. **โรคองุ่น เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร "หมอพืช-ไม้ผล"** ฉบับที่ 5 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หจก. เอ พลัส ทรี มีเดีย 45 น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิพนธ์ ทวีชัย. 2546. **การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี,** น. 55-88. *ใน* จิระเดช แจ่มสว่าง, บรรณาธิการ. **การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นันทกร บุญเกิด. 2546. **คู่มือการสร้างสวนองุ่น.** สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 น.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. **การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 149 น.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2538. **จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง**. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยงยุทธ ธำรงนิมิต. 2547. **โรคไม้ผล.** อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 136 น.

วิลาวัลย์ เจริญจิระตะกูล. 2539. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

วิไลรัตน์ ศรีนนท์. 2546. **การใช้เชื้อราต่อต้านในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสขององุ่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

สุทธ์สินี หักกะยานนท์. 2543. **องุ่นเงินล้าน.** นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ. 110 น.

สุพจน์ กาเซ็ม. 2545. **การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากผิวใบและดินบริเวณรากถั่วเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมคิด ดิสถาพร. 2540. **การป้องกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี**. กรมวิชาการเกษตร. 92 น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุเทพ ภาสุระ. 2536. **การผลิตมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma hazianum* โดยกระบวนการหมักอาหารเหลวเพื่อใช้ในงานควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางชีววิธี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2551. **การใช้บทปฏิบัติการเรื่องการควบคุมรา *Colletotrichum capsici* โดยยีสต์ในการสอนมโนทัศน์และความคิดเชิงวิพากษ์ของความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยมหิดล.

Ahmed, E.G., C.L. Wilson and M. Wisniewski. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology** 88: 282–291.

Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 603-635.

Arwiyanto, T., K. Sakata, M. Goto, S. Tsuyamu and Y. Takikama. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum.* **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 60: 288-294.

Avis, T.J. and R.R. Belanger. 2002. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. **FEMS Microbiol. Lett.** 2: 5-8.

Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogents. **Annu.Rev. Phytopathol**. 26: 67-85.

Baek, J.M., C.R. Howell and C.M. Kenerley. 1999. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics** 35: 41–50.

Barkai-Golan, R. 2001. **Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables**: Development and Control. Elesevier Science B.V., Amsterdam. 418 pp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Blachinsky, D., J. Antonov, A. Bercovitz, B. El-Ad, K. Feldman, A. Husid, M. Lazare, N. Marcov, I. Shamai, S. Droby and M. Keren-Zur. 2007. Commercial applications of Shemer for the control of pre- and post-harvest diseases**.** pp. 75–78. *In* **Proceedings of the meeting, Fundamental and Practice Approaches to Increase Biocontrol Efficacy** (OIBC/OILB: Dijon, France).

Calderon, A.A., J.M. Zapata, R. Munoz, M.A. Pedreno and A.R. Barcelo. 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. **New Phytologist** 124: 455–463.

Cook, R.J. 1991. Twenty-five years of progress towards biological control. **See Ref**. 41. pp. 1-14

Cook, R.J. 1993. The role of biological control in pest management in the 21st century. pp. 10-20 *In* R.D. Lumadon and J.L. Vaughn, eds. ASD Conference proceedings Series**. Pest Management: Biologically Based Technologies.**

Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul**, MN. 539 pp.

Christopher, C.S., A.G. Lindsay and S. Sandra. 2007. Studies on *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola*: Two fungi associated with bunch rot of grapes in sub-tropical Australia Bunch rot of grapes caused by *C. acutatum* and *G. uvicola.* **Australian Journal of Grape and Wine Research** 13:23–29.

Daykin, M. E. and R. D. Milholland. 1984. Ripe rot of muscadine grape caused by. *Colletotrichum gloeosporioides* and its control. **Phytopathology** 74:710-714.

Dickinson, C.H. and T.F. Preece. 1976. **Microbiology of Aerial Plant Surfaces**, Academic Press, London . 487p.

Droby, S., E. Chalutz, C.L. Wilson and M.E. Wisniewski. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomices hansenii* in the control of *Penicillum digitatum* on grapefruit. **Can. J. Microbiol.** 35 : 794-800.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology** 73: 85-88.

Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **Eur. J. Plant Pathol**. 102: 719–732.

Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action**. Crop Protect.** 19: 709-714.

Elad, Y. and A. Stewart, 2004. **Microbial control of *Botrytis* spp**. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control. Eds. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (Kluwer Academic Publishers: Netherlands) pp. 223–241.

Elmer, P.A.G. and T. Reglinski. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. **Plant Pathology** 55: 155–177.

Eveleigh, D.E. 1985. *Trichoderma*, pp. 487-509. *In* A. L. Demain and N. A. Solomon. eds. **Biology of industrial microorganism. Benjiamin Publishing** Co., California.

Fukaya, M. and I. Takahashi. 1999. " Effect and optimum Application Time of Strobilurins for the Control of Grape Ripe Rot (*Glomerella cingulata, Colletotrichum acutatum*)". **Annu. Rep. Soc. Plant Protect N Jpn**. 50 : 100-103

Harman, G.E., B. Latorre, E. Agosin, R. San Martin, D.G. Riegel, P.A. Nielsen, A. Tronsmo and R.C. Pearson. 1996. Biological and integrated control of botrytis bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. **Bio. Control** 7: 259–266.

Harman, G.E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* speices opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology** 2: 43-55.

Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. **Bio. Control** 47: 85–99.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Henis, Y., P. B. Adams, J. A. Lewis and G. C. Papavizas. 1983. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Phytopathology** 73: 1043-1046.

Howell, C.R., L.E. Hanson, R.D. Stipanovic and L.S. Puckhaber. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology** 90: 248–252.

Jacometti, M.A., S.D. Wratten and M. Walter. 2010. Review : Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research** 16: 154-172.

Karabulut, O.A., H. Tezcan, A. Daus, L. Cohen, B. Wiess and S. Droby. 2004. Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. **Biocontrol Science and Technology** 14: 513–521.

Kim, W. G. and S. K. Hong. 2008. Occurrence of anthracnose on peach tree caused by *Colletotrichum* species. **Plant Pathol. J.** 24:80-83.

Kim, W. G., S. K. Hong and Y. S. Park. 2007. Occurrence of anthracnose on fruits of Asian pear tree caused by *Colletotrichum acutatum*. **Mycobiology** 35: 238-240.

Kim, J. T., S. Y. Park, W. C. Choi, Y. H. Lee and H. T. Kim. 2008. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. **Plant Pathol. J.** 24:17-23.

Knudsen, G.R. and H.W Spurr. Jr. 1985. Management of bacterial populations for foliar disease biocontrol. *In* Biological control on the phylloplane, Windels, C.E. and Lindow, S.E., Eds., **Amer. Phytopath. Soc**, St. Paul., Minn. 10 p.

Koomen, I. and P.Jeffries. 1993. Effects of antagonistic microorganisms on the post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant pathol**. 42: 230-237.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Korsten. L., E.S. De Jager, E.E. De Villiers, A. Lourens, J.M. Kotze and F.C. Wehner. 1995. Evalution of Bacterial Epiphytes Isolated from Avocado Leaf and Fruit Surfaces for Biocontrol of Avocado Postharvest Diseases. **Plant Dis.** 79: 1149-1156.

Kurtzman, C.P. and S. Droby. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. **Systematic and Applied Microbiology**. 24: 395–399.

Lewis, M.L., C.N. Diaaz and S.A Miller. 2004. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Dis.** 88: 1198-1204.

Long, C.A., Z. Wu, and B.X. Deng. 2005. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by Strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. **European Food Research and Technology**. 221: 197–201.

Machowicz-Stefaniak, Z. 1998. Antagonistic activity of epiphytic fungi from grape-vine against *Botrytis cinerea* Pers. **Phytopathologia Polonica** 16: 45–52.

Melksham, K. J., M. A. Weckert, and C. C. Steel. 2002. An unusual bunch rot of grapes in subtropical regions of Australia caused by *Colletotrichum acutatum*. *Australas*. **Plant Pathol.** 31:193-194.

Mercier, J. and C.L. Wilson. 1994. Colonization of apple wounds by naturally-occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. **Bio. Control**. 4: 138–144.

Mohamed, N., J. Lherminier, M.J. Farmer, J. Fromentin, N. Beno, V. Houot, M.L. Milat and J.P. Blein. 2007. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. **Phytopathology** 97:611–620.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Morando, A., D. Bevione, P. Morandoand G. Ravizza. 2000. Powdery mildew control and collateral effects on grey mould and acid rot. **Atti Giornate Fitopatologiche** (Universita degli Studi di Bologna: Bologna, Italy) pp. 227–230.

Penyalver, R., B. Vicedo and M.M. Lopez. 2000**.** Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. **Eur. J. Plant Pathol.** 106: 801-810.

Saligkarias, I.D., F.T. Gravanis and H.A.S. Epton. 2002 a. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. In vivo studies. **Biol. Control**. 25: 143-150.

Saligkarias, I.D., F.T. Gravanis and H.A.S. Epton. 2002 b. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action. **Biol. Control.** 25: 151-161.

Sariah, M. 1994. Potential of *Bacillus* spp.as biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. **Malayian Applied Biol**. 23 (1-2): p. 53-60.

Santos, B.L., G.D. Paredes and F.R. Munoz. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum* causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plant. **Crop Protect**. 21: 11-15.

Schippers, B., B. Lugtenberg and P.J. Weisbeek. 1987. Plant growth control by fluorescent pseudomonads. pp. 19-40. *In* L. Chet, ed**. Inovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons**, New York.

Sesan, T., M. Oprea, A. Podosu Cristescu, C. Tica and F. Oancea, 1999. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. **Bull Pol Acad Sci Biol Sci.** 47: 197–205.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schena, L., F. Nigro, V. Soleti Ligorio, T. Yaseen, A. El Ghaouth and A. Ippolito, 2004. Biocontrol activity of Bio-Coat and Biosure against postharvest rots of table grapes and sweet cherries. **Central Valley Postharvest Newsletter** 13: 10.

Sivan, A. and I. Chet. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology** 79: 198.

Southworth, E. A. 1891. Ripe rot of grapes and apples. **J. Mycol.** 6:64-173.

Spadaro, D., R. Vola, S. Piano and M.L. Gullino. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples**. Postharvest Biol. Technol.** 24: 123-134.

Stiriling, A.M., L.M. Coates, K.G.Pegg and A.C. Hayward. 1995. Isolation and selection of bacteria and yeasts antagonistic to preharvest infection of avocado by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Australian Journal of Agricultural Research** 46 (5):985-995.

Tapio, E. and A . Pohtolahdenpera,. 1991. Scanning electronmicroscopy of hyphal interaction between *Streptomyces griseoviridis* and some plant pathogenic fungi. **Journal of Agricultural Science in Finland** 63: 435–441.

Thomson, J. 1987. the use of agrocin-producing barteria in the biological control of crown gall. pp. 213-228. *In* **L. Chet, ed. Inovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons,** New York. 372 pp.

Tronsmo, A. 1992. Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological control agents. In **Biological Control of Plant Diseases, Edited by E.S. Tjamos et al., Plenum Press**, New York. 12 p.

Trotel-Aziz, P., M. Couderchet, S. Biagianti and A. Aziz. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter, Bacillus, Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany** 64: 21–32.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Utkhede, R.S. and S. Mathur. 2002. Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Microbiology** 48: 550–554.

Vidhyasekaran, P. 2004. Biological control – Microbial pesticides. In: **Concise encyclopedia of plant pathology. Ed. P. Vidhyasekaran** (Food Products Press: Binghamton, USA) pp. 239–270.

Vero, S., P. Mondino, J. Burgueno, M. Soubes and M. Wisniewski. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biol. Technol.** 26: 91-98.

White, J.G., C.A. Linfield, M.L. Lahdenpera and J. Uoti. 1990. Mycostop – A novel biofungicide based on Streptomyces griseoviridis. **Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases** (British Crop Protection Council: Farnham, UK) pp. 221–226.

Whipps, M.J. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soilbone grasshouse pathogens and antagonistic fungi. **New Phytologist** 107: 127-142.

Wisniewski, M., C. Biles, S. Droby, R. Mclaughlin, C. Wilson and E. Chalutz. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea.* **Physiol. Mol. Plant Pathol**. 39: 245-258.

Yamamoto, J., T. Sato and K. Tomioka, 1999. Occurrence of ripe rot of grapes (*Vitis vinifera* L.) caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds**. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** 65:83-86.

Young, S. 2008. **New Zealand Agrichemical Manual** (Agri Media Ltd: Christchurch, New Zealand).

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Zahavi, T., L. Cohen. B. Weiss, L. Schena, A. Daus. T. Kaplunov , R.B. Arie and S. Droby.2000. Biological control of *Botrytis, Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel**. Postharvest Biol. Technol**. 20: 115-124.

Zhou, T., C.L. Chu, W.T. Liu and K.E. Schaneider. 2001. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae***. Can. J. Plant Pathol**. 23:246-252.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้หลังจากเตรียมเสร็จให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง (ปอกเปลือกแล้ว)	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

2. Nutrient glucose agar (NGA)

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	3.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

3. Nutrient glucose agar (NGB)

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	3.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. Yeast extract – Malt extract (YM) (Schaad, 1980)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

5. Martin's medium (Johnson and Curl, 1972)

KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Bacto Peptone	5.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร
Rose Bengal red (1%)	0.036	กรัม
Streptomycin	1.0	กรัม

ละลาย Rose Bengal ในน้ำก่อนผสมกับสารอื่น จากนั้นค่อยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ส่วน Streptomycin เติมก่อนเทอาหาร ในขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ทดสอบแกรมเชื้อแบคทีเรีย

Gram's stain

Crystal violet		
สารละลาย A		
Crystal violet (85% dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95 %	20.0	มิลลิลิตร
สารละลาย B		
Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร
Safranin O		
Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95 %	100.0	มิลลิลิตร
Gram's iodine solution		
Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร
Alcohol-acetone (decolorizer)		
Ethyl alcohol 95%	250.0	มิลลิลิตร
Acetone	250.0	มิลลิลิตร

สารละลาย 3% KOH (potassium hydroxide)

potassium hydroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจุฑารัตน์ เพชรแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ประสบการณ์การทำงาน	ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการวิจัย การศึกษาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้พื้นเมืองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช
ประชุมวิชาการ/ผลงาน	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่น หน้า 545-557 ในรายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 24-26 พฤศจิกายน 2552 โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาและเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลองุ่น ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 10 วันที่ 18-20 พฤษภาคม 2554 โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์