

การควบคุมโรคเหี่ยวของพริกหวาน

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟท็อปเธอราใบดำของพริกหวาน

นำตัวอย่างของโรคมารับการแยกเชื้อโดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1.1 วิธีการแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่แสดงอาการของโรคภายในสภาพกล่องที่มีความชื้นสูง

ลำต้นที่แสดงอาการของโรค

นำตัวอย่างต้นพริกหวานที่เป็นโรคมารับบริเวณโคนต้นเหนือดิน มาเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นมาเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางในกล่องความชื้นซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชู ซึ่งเทน้ำกลั่นมาเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง นำเส้นใยของเชื้อที่เจริญออกมาจากแผลที่ได้จากการทำ moist chamber มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จานละ 4 ตำแหน่งทำในสภาพปลอดเชื้อ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยขอบโคโลนีมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

ผลที่แสดงอาการของโรค

นำตัวอย่างผลพริกหวานที่เป็นโรค มาเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นมาเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางในกล่องความชื้นซึ่งภายในปูด้วยกระดาษทิชชูซึ่ง เทน้ำกลั่นมาเชื้อลงไปให้พอชุ่ม ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเย็บเส้นใยที่ขึ้นฟูบนบริเวณผลพริกหวาน มาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเป็นโคโลนีใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยที่ขอบโคโลนีมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพร้อมจะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นพริกเพื่อหาสาเหตุของโรคอย่างแท้จริงต่อไป

1.2 วิธีการล่อเชื้อจากวัสดุปลูก

ล่อเชื้อจากวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้แครอทและพริกหวาน

มาเชื้อที่ติดมากับผิวของพืชที่ใช้ล่อเชื้อในวัสดุปลูกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการใช้น้ำกลั่นมาเชื้อล้างแอลกอฮอล์ออก หั่นพืชด้วยมีดมาเชื้อให้ชิ้นพืชมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส (ลูกเต๋า) ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชิ้นพืชไปวางบนวัสดุปลูกให้ชิ้นพืชจมลงไปประมาณ

0.5 เซนติเมตรซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกใส ใส่ น้ำกลั่นมาเชื้อลงไปพอคืนขึ้นหมาดๆ ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้นาน 5 วัน ตรวจดูการเจริญของเชื้อที่ขึ้นบนชิ้นพืชโดยการทำสไลด์และนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บเส้นใยที่ขึ้นบนเหยื่อล่อไปเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยของเชื้อมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ล่อเชื้อจากวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบสับปะรด

นำใบสับปะรดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ 2-3 ครั้ง ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว หั่นตรงส่วนโคนใบเพื่อให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายของวัสดุปลูก (ผสมด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ) ซึ่งเป็นวัสดุปลูกจากต้นที่แสดงอาการของโรค โดยจุ่มตรงโคนใบลงไป จากนั้นนำบีกเกอร์ที่มีใบสับปะรดจุ่มในสารละลายวัสดุปลูกใส่ลงในถุงพลาสติกและมัดปากถุงให้แน่น ตรวจผลทุกวันเพื่อดูผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Phytophthora* sp. หลังจากนั้น 8 วันนำใบสับปะรดดังกล่าวไปบ่มเชื้อไว้ในกล่องให้ความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-5 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญออกมาจากแผล จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บเส้นใยบริเวณดังกล่าวไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำไปเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA จานละ 4 ตำแหน่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน ใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายของเส้นใยเส้นใยขอบโคโลนีของเชื้อมาเลี้ยงลงบนอาหาร half PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพร้อมจะนำไปทดสอบการเกิดโรคกับต้นพริกเพื่อหาสาเหตุของโรคอย่างแท้จริงต่อไป

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจากส่วนต่างๆของพริกหวาน

2.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบ ลำต้น ราก และวัสดุปลูกของพริกหวานจากโรงเรือนปลูกพริกหวาน ตำบลโป่งแยง

อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง หรือแสดงอาการของโรค

2.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจากส่วนต่างๆของพริกหวาน

นำตัวอย่างใบพืชมาล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างผ่านน้ำไหล (running water) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง ใช้กรรไกรตัดใบ ลำต้นและราก ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนของพืชแช่ในสารละลาย sodium hypochloride ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงย้ายแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับชิ้นพืช

ให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูมาเชื้อ ผึ่งลมให้แห้ง วางขึ้นฟิชจำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานอาหารบนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม (บาวิสดิน 50% เอฟแอล) อัตรา 150 μ l ต่ออาหาร IMA-2 150 ml บ่มเชื้อไว้ในตู้มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน

2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ให้บริสุทธิ์

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ loop ที่ลนไฟมาเชื้อ ย้ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากขึ้นฟิช streak ลงบนอาหาร NA บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง แล้วคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ เก็บไว้เป็น stock culture ในหลอดอาหาร NA บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีผลในการยับยั้ง

การเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียปฏิบัฏ์จำนวน 12 ไอโซเลทที่ทำการคัดเลือกแล้วในขั้นต้นมาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิบัฏ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ ด้วยวิธี dual culture โดยทดสอบในจานอาหารเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 9 เซนติเมตร นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA โดยให้ห่างจากตำแหน่งที่จะวางเชื้อสาเหตุ 5 เซนติเมตร บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง 24- 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์เจริญสมบูรณ์ จากนั้นจึงใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลท วางบนอาหาร PDA ที่จัดเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ไว้แล้ว ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลทคือ T 15 และ T 75 (T 15 แยกได้จากดินในอำเภอสันทรายและ T 75 แยกได้จากดินอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้มีการศึกษามาจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้และได้นำมาเพื่อทดสอบควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในโครงการนี้) เพื่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในแต่ละไอโซเลทจะทำการวางเชื้อสาเหตุ *Phytophthora* sp. โดยเจาะขึ้นรู้นบริเวณขอบโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ขนาด 0.5 เซนติเมตรลงบนอาหาร PDA ก่อน 2 วันให้ห่างจากตำแหน่งที่จะวางเชื้อ *Trichoderma* sp. 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงจะนำเชื้อ *Trichoderma* sp. มาวางลงบนอาหาร PDA ที่วางเชื้อราสาเหตุไว้แล้ว บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์และเชื้อรา *Trichoderma* sp. แบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อสาเหตุอย่างเดียวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงบันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth ; PIRG)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG)

$$\text{PIRG} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ

นำแบคทีเรียปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรค ไฟทอปธอราไปลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีบนอาหาร NA ทดสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิบัติ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติจำนวน 2 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ สาเหตุโรค streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนีบนอาหาร NA ทดสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการย้อมสีแบบแกรม (gram's stain) เริ่มจากทำความสะอาดสไลด์และทำให้แห้ง โดยวิธีการผ่านไฟหรือเช็ดด้วยกระดาษหรือผ้าสะอาด แล้ว smear เชื้อที่ต้องการจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ทำโดยใช้ loop จุ่มน้ำและลงบนสไลด์ 1-2 loop แล้วใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อ เชื้อเชื้อมาเพียงเล็กน้อย และเชื้อลงบนหยดน้ำ แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายออกเป็นวงเล็กๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นทำการตรึง (fixing of the smear) เพื่อให้เซลล์ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสี Crystal violet ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือทิ้งบนสไลด์ทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้น หยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอย smear และทิ้งไว้นาน 1 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าทำให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ ชับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี Safranin-O ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับวางทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจดูลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัวของแบคทีเรีย

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

ศึกษาถึงผลของปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติที่มีผลต่อสารเคมีที่เติมลงในอาหารและดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเช่น การทดสอบแคตาเลส การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis Test) เปรียบเทียบกับคู่มือ Bergey's Manual of Determination Bacteriology 9th ed. (Holt *et al.*, 1994)

4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เรียกด้วยเครื่อง **BiologTM Microlog System, Release**

นำเชื้อแบคทีเรียที่เรียกให้ประสิทธิภาพสูงสุดมาจำแนกชนิด ด้วยเครื่อง **BiologTM**

Microlog System, Release 4.2 ซึ่งทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source) ของแบคทีเรียที่เรียกที่แตกต่างกัน 95 ชนิด

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกต่อการออกของเมล็ดพริกหวาน

การเตรียมเมล็ดพริกหวาน

นำเมล็ดพริกหวานพันธุ์ลูกผสม วีก้า (Vega 1288) จากบริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการของ Errakhi *et al.* (2007) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่เรียก ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เรียกให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้อากาศปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ชูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆ แล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร

การทดสอบการออกของเมล็ดพริกหวานบนกระดาษขึ้น

นำเมล็ดพริกหวานที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียที่เรียกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุจากขั้นตอนที่ 4 จำนวน 2 ไอโซเลท ความเข้มข้น 10^8 cfu/ มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษขึ้น (blotter method) โดยนำเมล็ดพริกหวานวางบนกระดาษเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุกระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่น ใ้ด้้านบนและกระดาษฟาง 3 แผ่นที่ชุบน้ำจนชุ่ม ใ้ด้้านล่าง วางเมล็ดพริกหวานจำนวน 25 เมล็ดต่อจาน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจสอบการออกของเมล็ดพริกหวานโดยการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เรียก

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวาน

การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท โดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแบคทีเรีย มา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ภายใต้อากาศปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในจานอาหาร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดแบคทีเรียให้หลุดจากผิวหน้าของอาหารเบาๆแล้วเทรวมกันในปิเกตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 ทำการเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

6.1 ทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

เพื่อให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกมา 2 ไอโซเลท จะไม่ทำให้เกิดโรคหรือยับยั้งการเจริญแก่ต้นพริกหวาน จึงนำเมล็ดพริกหวานที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว ปลูกลงในดินฆ่าเชื้อซึ่งบรรจุในกระบะเพาะ คูแตรค้ำอย่างสม่ำเสมอจนต้นพริกหวานอายุ 30 วัน จึงย้ายไปปลูกในกระถางพลาสติก กระถางละ 4 ต้น ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อพืชโดยการราดสารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละไอโซเลทและผสมระหว่างไอโซเลททั้งสองความเข้มข้น 10^8 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้นลงบนต้นพืชเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งราดด้วยน้ำกลั่น สังเกตและบันทึกผลหลังการใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นเวลา 28 วัน

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวานในสภาพโรงเรือน

วางแผนการทดลองในโรงเรือนปลูกพริกหวานของเกษตรกร ที่มีการจัดการให้น้ำและปุ๋ยดังนี้ T1= ปุ๋ยเกษตรกร T2 = ปุ๋ยหมัก ทำการราดสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^8 cfu/มิลลิลิตร) (ใช้ *Pseudomonas spinosa* แทน *Pseudomonas aeruginosa* ที่สามารถก่อให้เกิดในคนได้) ต่อถุงปลูก ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 จะใช้ข้าวฟ่างปริมาตร 20 เมล็ดต่อถุงปลูก ทำการทดลองโดยเติมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในทุกๆ 1 เดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน (เม.ย. – มิ.ย. 2552) แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) มี 8 ซ้ำ และ 10 กรรมวิธีการทดลองโดยมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	T1 + B
กรรมวิธีที่ 2	T1 + P
กรรมวิธีที่ 3	T1 + T
กรรมวิธีที่ 4	T1 + B+P
กรรมวิธีที่ 5	T1 + W (Water)
กรรมวิธีที่ 6	T2 + B
กรรมวิธีที่ 7	T2 + P
กรรมวิธีที่ 8	T2 + T
กรรมวิธีที่ 9	T2 + B+P
กรรมวิธีที่ 10	T2 + W (Water)

B = *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20

P = *Pseudomonas spinosa*

T = *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T75

W = น้ำเปล่า

ทำการวัดความสูงของต้นพริกหวานและชั่งน้ำหนักสดของผลผลิตที่ได้ในแต่ละกรรมวิธี หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Statistix for Window version 8.0

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวาน

จากการศึกษาโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวาน พบว่าโรคนี้อ่อนให้เกิดความเสียหายในทุก ระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของต้นพืช การเข้าทำลายในระยะต้นอ่อน เชื้อสาเหตุจะเข้าทำลาย บริเวณโคนต้น แผลจะมีลักษณะคล้ายโคนน้ำร้อนลวก ทำให้ต้นกล้าล้มพับลงและแห้งตาย (ภาพที่ 1 ก) ส่วนอาการที่ผล ผลจะช้ำแผลมีสีน้ำตาล และเน่า มีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมทั่วบริเวณ (ภาพที่ 1 ข) เชื้อ สาเหตุบริสุทธิ์ที่แยกได้มีลักษณะเส้นใยสีขาวคล้ายล้าเจริญขึ้นเหนือผิวหน้าอาหารและมีรูปแบบการ เจริญของเส้นใยแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่มีการสร้าง sporangium หลายรูปแบบ ตรงปลายมองเห็น papilla ชัดเจน ซึ่งเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้มี 5 ไอโซเลทจากวิธีการแยกเชื้อที่แตกต่างกันดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2-6



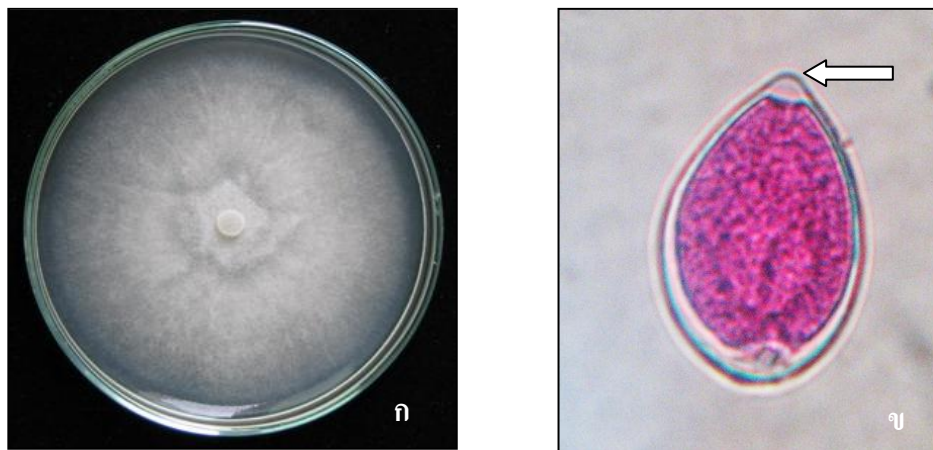
ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคไฟทอปธอราไบลท์ของพริกหวานที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

ก. แผลบริเวณโคนต้นมีลักษณะคล้ายโคนน้ำร้อนลวก แผลมีสีน้ำตาล

ข. ผลเน่า และบริเวณแผลมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราปกคลุมทั่วผล

ตารางที่ 1 เชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลตที่แยกจากวิธีการต่างกัน

เชื้อ	วิธีการและตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ
<i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลต 01 (ภาพที่ 2)	Moist chamber (โคนต้นที่เกิดโรค)
<i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลต 02 (ภาพที่ 3)	ล่อเชื้อด้วยแครอท (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
<i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลต 03 (ภาพที่ 4)	ล่อเชื้อโดยใช้ใบสับปะรด (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
<i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลต 04 (ภาพที่ 5)	ล่อเชื้อโดยใช้ใบสับปะรด (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
<i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลต 05 (ภาพที่ 6)	Moist chamber (ผลที่เกิดโรค)

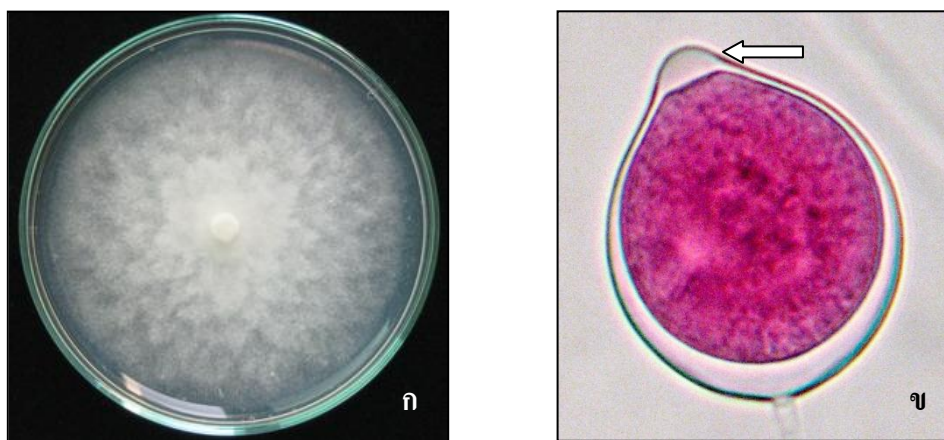


ภาพที่ 2 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท 01

สาเหตุโรคไฟทอปเธอราใบกล้วย

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว ฟูละเอียดคล้ายสำลี รูปแบบการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ slightly stellate อายุ 9 วัน

ข. ลักษณะ sporangia รูปมะนาว มี papilla ตรงปลาย (ศรีษะ) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

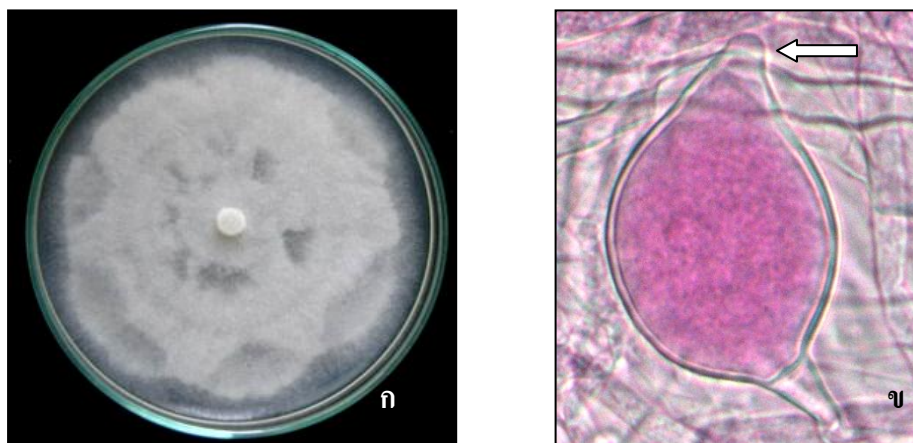


ภาพที่ 3 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท 02

สาเหตุโรคไฟทอปเธอราใบกล้วย

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว ฟูละเอียดคล้ายสำลี รูปแบบการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ rosette อายุ 9 วัน

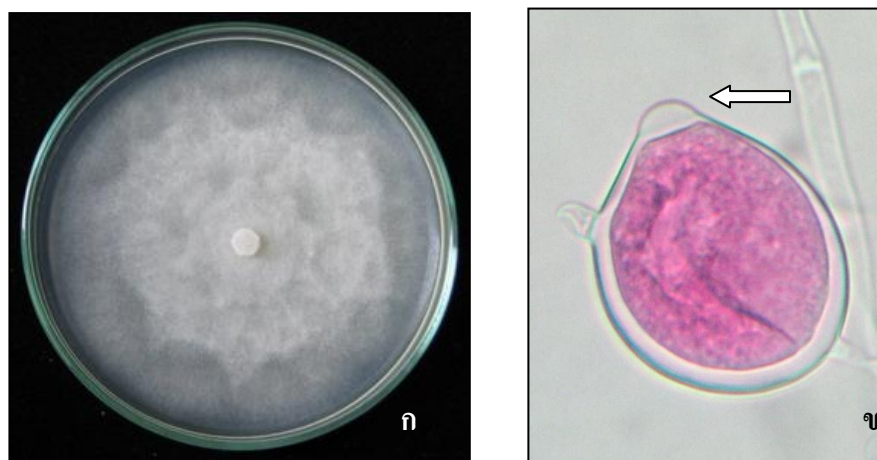
ข. ลักษณะ sporangia เป็นแบบ obpyriform มี papilla ตรงปลาย (ศรีษะ) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท 03 สาเหตุโรคไฟทอปเธอราใบกล้วย

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว ฟุ้งละเอียดคล้ายสำลี รูปแบบการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ slightly stellate อายุ 9 วัน

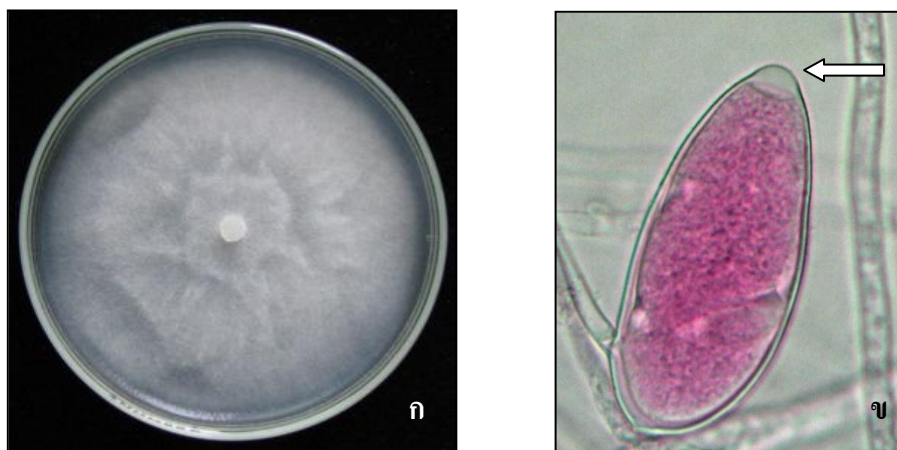
ข. ลักษณะ sporangia เป็นแบบ ovoid-pyriform มี papilla ตรงปลาย (ศรีษะ) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 5 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท 04 สาเหตุโรคไฟทอปเธอราใบกล้วย

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว ฟุ้งละเอียดคล้ายสำลี รูปแบบการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ slightly petallate อายุ 9 วัน

ข. ลักษณะ sporangia เป็นแบบ obpyriform มี papilla ตรงปลาย (ศรีษะ) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 6 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลต 05

สาเหตุโรคไฟทอปเธอราใบกล้วย

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสีขาว ฟูละเอียดคล้ายสำลี รูปแบบการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ slightly stellate อายุ 9 วัน

ข. ลักษณะ sporangia เป็นแบบ ellipsoid มี papilla ตรงปลาย (ศรีษะ) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏจากส่วนต่าง ๆ ของพริกหวาน

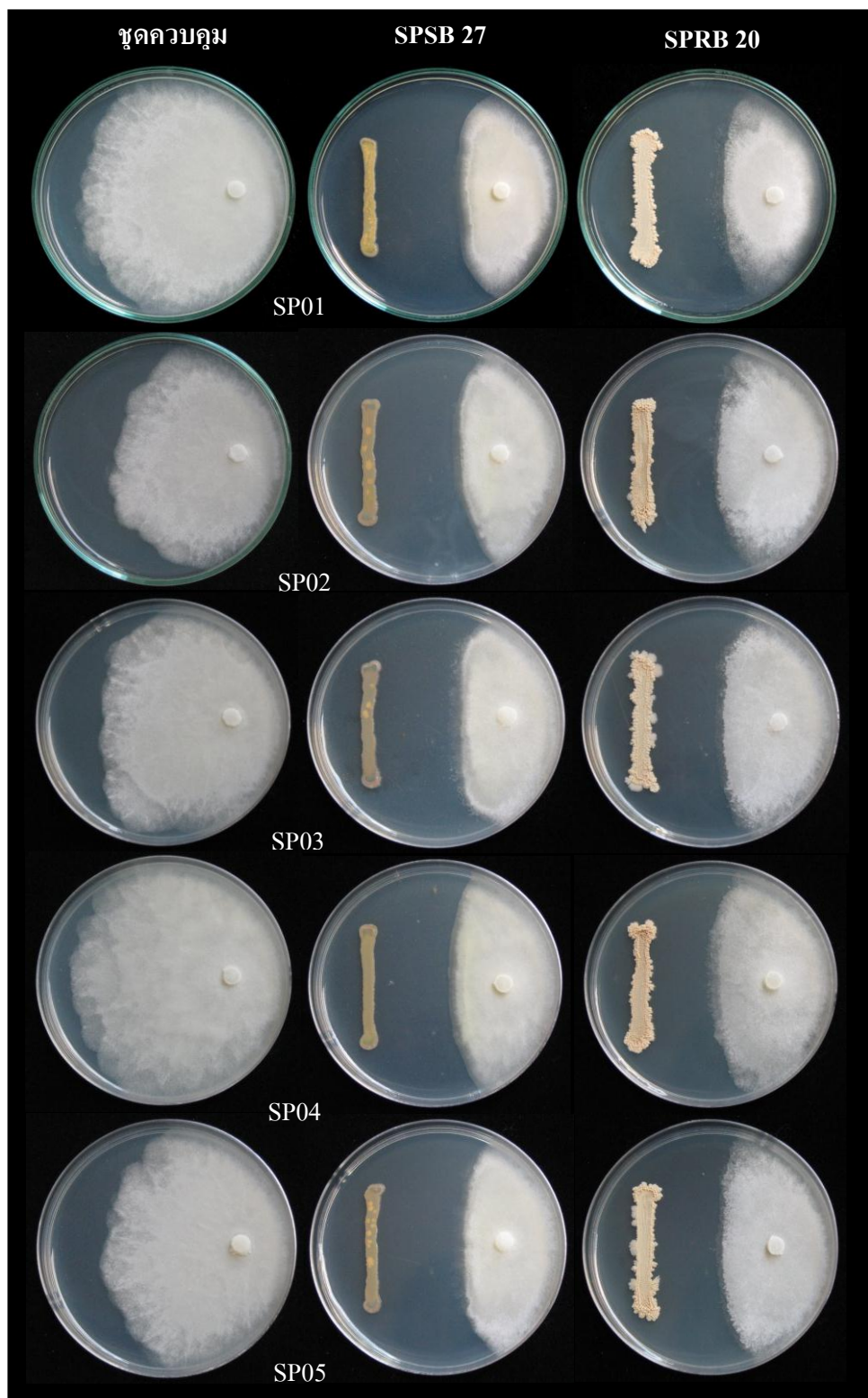
จากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏจากส่วนต่างๆของพริกหวานบนอาหาร IMA -2 เป็นเวลา 1 เดือน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏได้รวม 177 ไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบจำนวนพบว่าส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนใบ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏทั้งหมด 87 ไอโซเลต ส่วนของลำต้น 50 ไอโซเลต ส่วนราก 18 ไอโซเลต และส่วนวัสดุปลูก 22 ไอโซเลต ซึ่งแอคติโนมัยซีตเอนโคไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดแยกได้จากส่วนรากดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนไอโซเลตและชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏที่แยกได้จากส่วนต่างๆของพริกหวาน หลัง การเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 นาน 1 เดือน

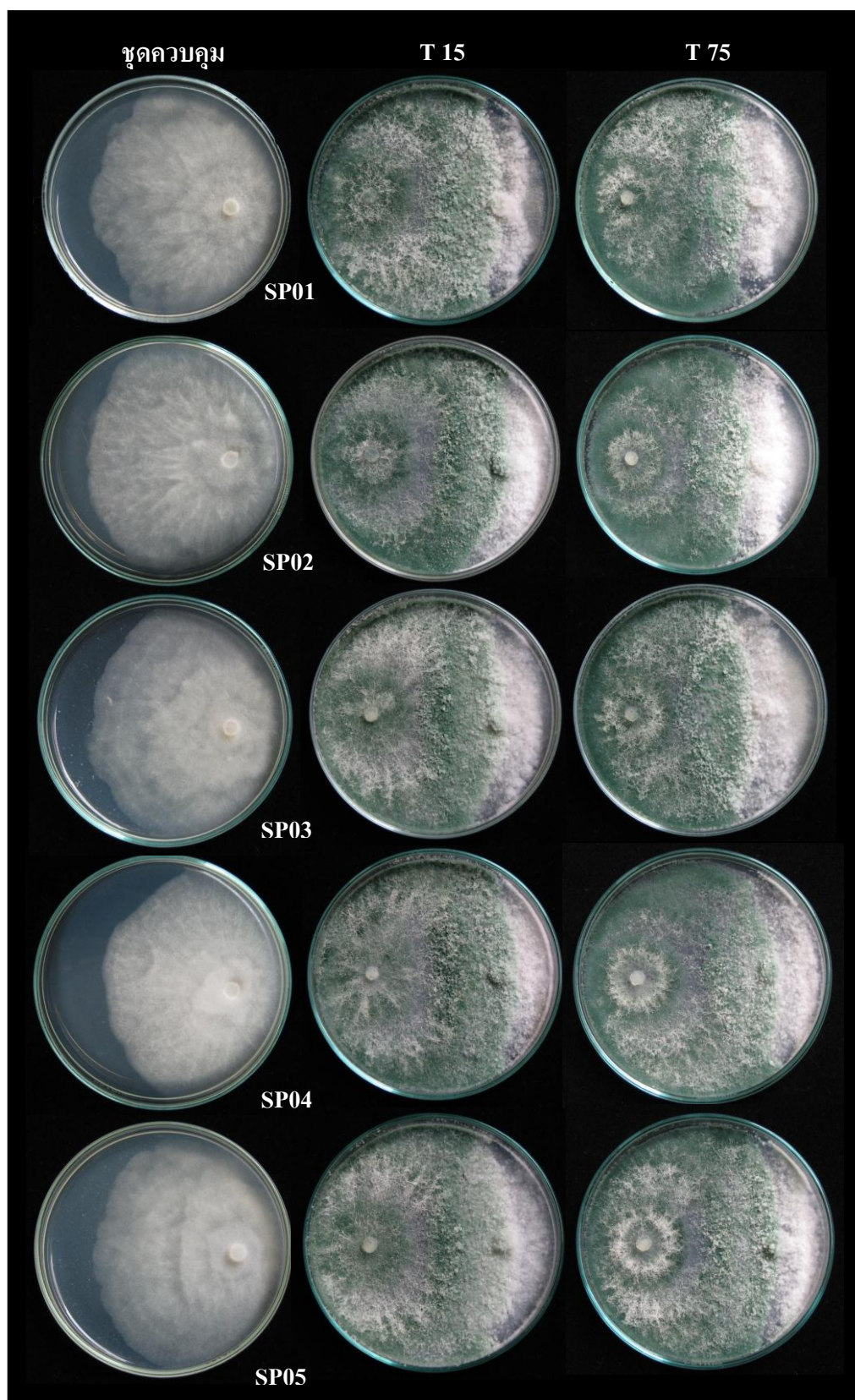
ส่วนต่างๆของพริกหวาน	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้
ใบ	87
ลำต้น	50
ราก	18
วัสดุปลูก	22

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากส่วนต่างๆของพริกหวานมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบปลี โดยวิธี dual culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ 2 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลทได้สูงสุด และให้ผลการวัดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ต่อการเจริญเชื้อสาเหตุได้แตกต่างจากชุดควบคุม ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท SPSB 27 และ SPRB 20 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในไอโซเลท SP01 เท่ากับ 66.67 และ 61.33 ไอโซเลท SP02 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.76 และ 56.63 ตามลำดับ ไอโซเลท SP03 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 65.00 และ 59.50 ตามลำดับ ไอโซเลท SP04 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 62.63 และ 56.07 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SP05 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 65.22 และ 58.26 ตามลำดับ (ภาพ 7 และตาราง 3) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T15 และ T75 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในแต่ละไอโซเลทดังนี้ ไอโซเลท SP01 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 61.01 และ 60.01 ตามลำดับ ไอโซเลท SP02 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 46.92 และ 46.43 ตามลำดับ ไอโซเลท SP03 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 43.27 และ 41.35 ตามลำดับ ไอโซเลท SP04 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 43.69 และ 47.89 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SP05 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 42.16 และ 41.69 ตามลำดับ(ภาพ 8 และตาราง3) โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของ T15 และ T75 ไม่แตกต่างกันดังนั้นจึงคัดเลือก T75 มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพโรงเรือน



ภาพที่ 7 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในแต่ละไอโซเลต สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบลท โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SPSB 27 และ SPRB 20 โดยวิธี dual culture



ภาพที่ 8 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในแต่ละไอโซเลต สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบดก โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต T15 และ T75 โดยวิธี dual culture

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบลท์ของพริกหวานโดยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราปฏิปักษ์

เชื้อปฏิปักษ์		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ¹ (%)				
		Isolate				
		SP01	SP02	SP03	SP04	SP05
Bacteria	SPSB 27	66.67 ^a	62.76 ^a	65.00 ^a	62.63 ^a	65.22 ^a
	SPRB20	61.33 ^a	56.63 ^b	59.50 ^{ab}	56.07 ^b	58.26 ^{ab}
LSD _{0.01}		6.29	4.63	6.17	5.42	7.47
CV (%)		7.08	4.09	5.24	4.75	6.39
<i>Trichoderma</i> sp.	T15	61.01 ^a	46.92 ^a	43.27 ^a	43.69 ^a	42.16 ^a
	T75	60.01 ^a	46.43 ^a	41.35 ^a	47.89 ^a	41.69 ^a
LSD _{0.01}		5.52	11.11	5.42	8.81	5.46
CV (%)		3.74	10.61	6.71	12.03	6.89

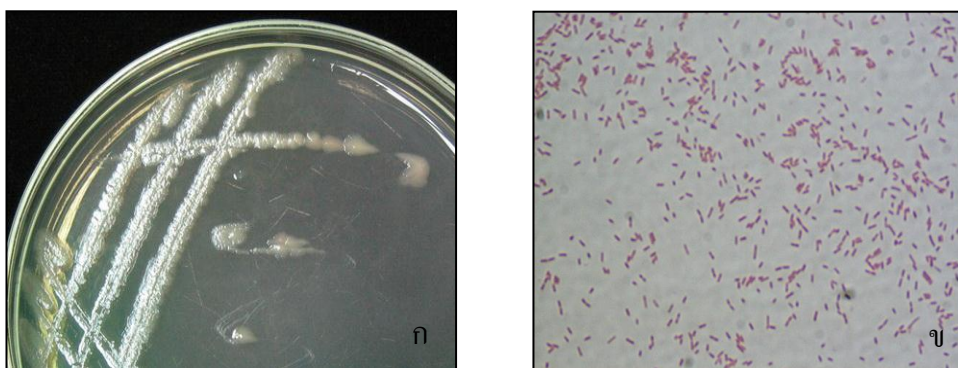
1 = ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

2 = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

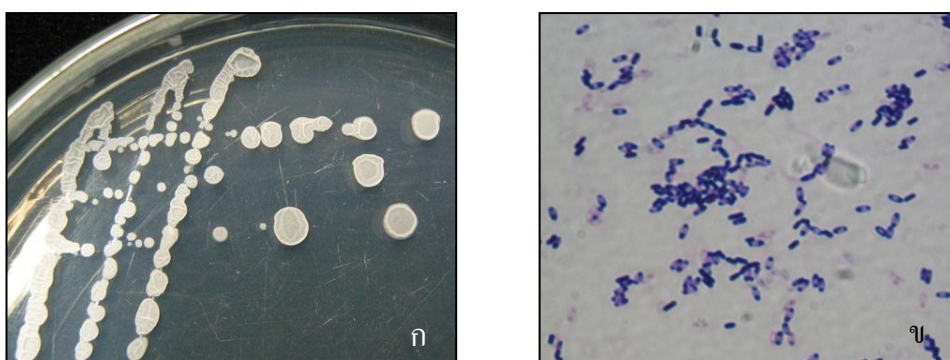
เมื่อศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลตได้แก่ SPSB 27 และ SPRB 20 ที่เจริญบนอาหาร NA พบว่าในไอโซเลต SPSB 27 โคโลนีมีสีเหลือง ขนาดเล็ก นูน ขอบเรียบ เมื่อเก็บไว้นานจะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วง ลักษณะการติดสีแกรมติดสีแดง (ภาพที่ 9) ส่วนไอโซเลต SPRB 20 โคโลนีมีสีครีม ขนาดเล็ก นูน ผิวหนายน ขอบเรียบ ลักษณะการติดสีแกรมติดสีม่วง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกปฏิบัติไอโซเลท SPSB 27 บนอาหาร NA

ก. โคโลนีมีสีเหลือง นูน ขนาดเล็ก

ข. ลักษณะการติดสีแดง แกรมลบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกปฏิบัติไอโซเลท SPRB 20

ก. โคโลนีมีสีครีม ขนาดเล็ก นูน ผิวหน้าขุ่น ขอบเรียบ

ข. ลักษณะการติดสีม่วง แกรมบวก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอราไบลท์ในพริกหวาน เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย นั้นสามารถสรุปได้เบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เรียกปฏิบัติไอโซเลท SPSB 27 อาจจัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* (*Aeromonas*, *Pseudomonas* หรือ *Vibrio*) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เรียกปฏิบัติไอโซเลท SPRB 20 จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	Isolate					
	Ps A	BA	BM	BS	SPSB 27	SPRB 20
Catalase	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	–	+	+	+	–	+
Citrate utilization	+	–	–	–	+	–
Motility test	+	+	+	+	+	+
O-F test	+	–	–	+	+	+
Arabinose fermentation	+	–	–	–	+	–
Urease	+	+	+	+	+	+
Manitol fermentation	–	+	+	+	–	+
MR	–	–	–	–	–	–
VP	–	+	+	+	–	+
indole	–	–	–	–	–	–
Nitrate reduction	–	–	–	–	–	–
Growth at 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+
Pyocyanin formation	+	–	–	–	+	–
Cellulase	nt	nt	nt	nt	-	+
Phosphatase	nt	nt	nt	nt	-	+

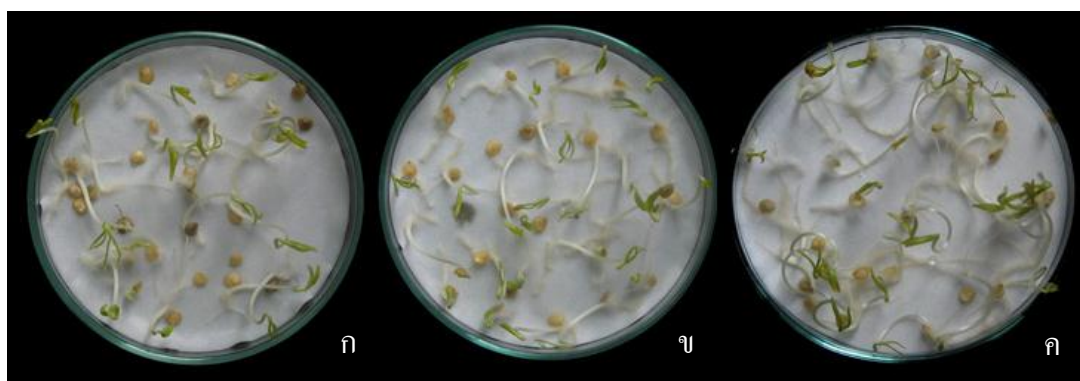
หมายเหตุ Ps A : *Pseudomonas aeruginosa*, BA: *Bacillus amyloliquefaciens*, BM: *Bacillus megaterium*, BS: *Bacillus subtilis*

- = negative, + = positive, nt = non test

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สูงสุด 2 ไอโซเลท คือ SPSB 27 และ SPRB 20 มาทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Biolog™ Microlog System, Release 4.2 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 คือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens*

5. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกหวาน

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ 2 ไอโซเลทได้แก่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 และ *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20 ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพริกหวานบนกระดาดขึ้น พบว่าเมล็ดพริกหวานเริ่มงอกหลังจากเพาะเมล็ดได้ 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกภายหลังจากการเพาะ 14 วัน พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดเป็น 93 ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 90 ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (น้ำเปล่า) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 80 (ภาพที่ 11 และตารางที่ 5)



ภาพที่ 11 ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกหวานภายหลังจากการเพาะเมล็ดบนกระดาดขึ้นเป็นเวลา 14 วัน

ก. ชุดควบคุม

ข. *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20

ค. *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพริกหวานหลังจากเพาะบนกระดาดขึ้นเป็นเวลา 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพริกหวานหลัง จากเพาะบนกระดาดขึ้น ¹	
ชุดควบคุม		80
<i>B. amyloliquefaciens</i> SPRB 20		93
<i>P. aeruginosa</i> SPSB 27		90

LSD ($P=0.05$) = 10.39

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

ภายหลังจากการเพาะเมล็ดพริกหวาน 14 วันบนกระดาดขึ้นได้น้ำต้นกล้าพริกมาซึ่งน้ำนักสดและแห้ง พบว่าทั้งสามกรรมวิธีคือการใช้ *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20, *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 และน้ำเปล่า (ชุดควบคุม) ให้น้ำนักสดและน้ำนักแห้งของต้นกล้าไม่แตกต่างกัน โดยน้ำนักสดซึ่งได้เฉลี่ย 0.0475 - 0.0525 กรัมต่อต้น ส่วนน้ำนักแห้งซึ่งได้เฉลี่ย 0.0053 - 0.0059 กรัมต่อต้น ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ทำให้การงอกของเมล็ดพริกหวานลดลง

ตารางที่ 6 น้ำหนักของต้นกล้าพริกหวานอายุ 14 วันที่เพาะบนกระดาดขึ้น

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยของต้นกล้าพริกหวานหลังจากเพาะได้ 14 วัน	
	(กรัม) ¹	
	น้ำนักสด	น้ำนักแห้ง
ชุดควบคุม	0.0475 a ²	0.0059 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> SPRB 20	0.0475 a	0.0057 a
<i>Ps. aeruginosa</i> SPSB 27	0.0525 a	0.0053 a
LSD ($P=0.05$)	0.0080	0.0010
CV (%)	10.17	10.19

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอราใบล้าของพริกหวาน

6.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 และผสมระหว่างไอโซเลททั้งสอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพริก เมื่อทำการวัดความสูงของต้นพริก ความยาวของราก น้ำนักสด และน้ำนักแห้ง ภายหลังจากการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพริกดีที่สุด ซึ่งให้ความยาวรากสูงสุด โดยมีความยาวรากเป็น 19.28 เซนติเมตร

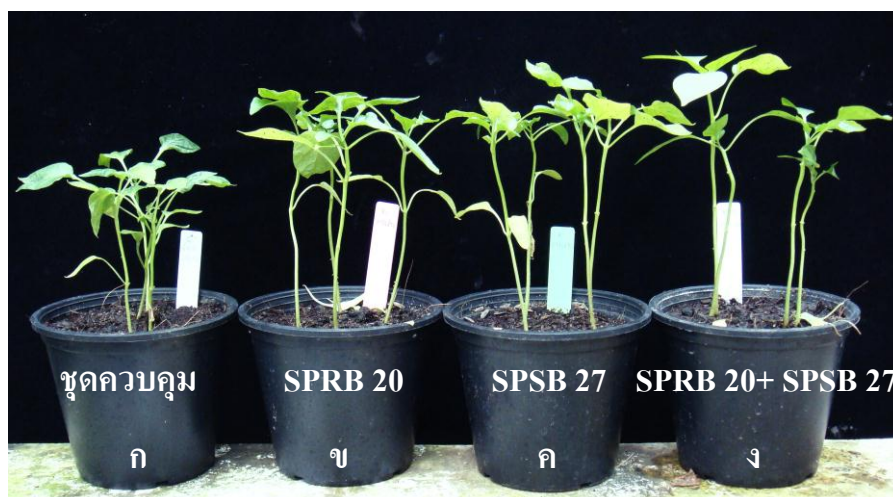
ในขณะที่ความสูงของต้นเป็น 18.31 เซนติเมตรซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิบัฏ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ที่ให้ความสูงของต้นเป็น 18.28 เซนติเมตร ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งพบว่าในทุกกรรมวิธีให้น้ำหนักที่ไม่แตกต่างกัน โดยต้นพริกมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.88-1.13 กรัมและน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.17 - 0.19 กรัม กรรมวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิบัฏ *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 ให้ประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีความสูงของต้นเป็น 19.56 เซนติเมตร ความยาวรากเป็น 17.22 เซนติเมตรซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้ *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 ที่มีความยาวรากเป็น 16.28 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมมีความสูงของต้นเป็น 17.26 เซนติเมตร และมีความยาวรากเป็น 14.75 เซนติเมตร (ตารางที่ 7 และภาพที่ 12)

ตารางที่ 7 ความสูง ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของพริกหวานหลังการใช้แบคทีเรียปฏิบัฏราดบริเวณโคนต้น 28 วัน

แบคทีเรียปฏิบัฏ	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) ¹	ความยาวราก (เซนติเมตร) ¹	น้ำหนักสด (กรัม) ¹	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ¹
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	17.26 b ²	14.75 b	0.88 a	0.17 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> SPRB 20	19.56 a	17.22 ab	0.99 a	0.17 a
<i>Ps. aeruginosa</i> SPSB 27	18.28 ab	16.28 ab	0.88 a	0.18 a
SPSB 27 + SPRB 20	18.31 ab	19.28 a	1.13 a	0.19 a
LSD ($P=0.05$)	2.00	3.68	0.2985	0.0695
CV (%)	15.44	30.88	43.48	55.53

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น

² ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบ โดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบต้นพริกหวานแต่ละกรรมวิธีหลังจากใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน

ก. ชดควบคุม

ข. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amylogluefaciens* SPRB 20

ค. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. aeruginosa* SPSB 27

ง. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่างไอโซเลท SPRB 20 และ SPSB 27

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวานในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amylogluefaciens* SPRB 20 และ *Ps. spinosa* ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 ในการควบคุมโรคไฟทอปธอราใบล่ของพริกหวาน ที่มีการจัดการระบบน้ำและการให้น้ำ 2 แบบ ได้แก่ T1 = ให้น้ำเกษตรกร T2 = ให้น้ำหมัก ทำการบันทึกความสูงของต้นพริกหวานและชั่งน้ำหนักสดของผลผลิตทุกเดือน เป็นระยะเวลา 3 เดือน (เม.ย.-มิ.ย.2552) จากนั้นนำข้อมูลความสูงของต้นและผลผลิตพริกหวานในเดือนสุดท้ายมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยกรรมวิธีที่มีการให้น้ำและให้น้ำหมัก T2 ร่วมกับการใช้ *B. amylogluefaciens* SPRB 20, *Ps. spinosa* และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75 ต้นพริกหวานมีความสูงไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่มีการให้น้ำและให้น้ำ T1 ร่วมกับการใช้ *B. amylogluefaciens* SPRB 20 และ *Ps. spinosa* โดยมีความสูงเฉลี่ย 106.88 - 140.25 เซนติเมตร แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่าในการให้น้ำและให้น้ำ T2, T1 ซึ่งมีความสูงเป็น 100.71 เซนติเมตรและ 102.25 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 9) ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักสดของผลผลิตพริกหวานพบว่า การให้น้ำและให้น้ำหมัก T2 ร่วมกับการใช้แบคทีเรีย *Ps. spinosa* ให้น้ำหนักผลผลิตสูงสุดเป็น 1579.4 กรัม ส่วนการให้น้ำและให้น้ำ T1 ร่วมกับการผสมระหว่าง *B. amylogluefaciens* SPRB 20 และ *Ps. spinosa* ให้น้ำหนักผลผลิตต่ำสุดเป็น 830.55 กรัมดังตารางที่ 11

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลความสูงของต้นพริกหวานทางสถิติแบบ Randomized Complete Block design ภายหลังการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 เป็นระยะเวลา 3 เดือนภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	3842.9	426.992	1.09	0.4148
Error	20	7866.5	393.327		
Corrected Total	29	11709.5			
CV (%)	18.17				

ตารางที่ 9 ความสูงของต้นพริกหวานภายหลังการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 เป็นระยะเวลา 3 เดือนภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน

กรรมวิธี	ความสูงของต้นพริกหวาน(ซม.) ¹
T1 + B	112.00 ab ²
T1 + P	112.84 ab
T1 + T	104.34 b
T1 + B+T	97.46 b
T1 + W	102.25 b
T2 + B	140.25 a
T2 + P	108.38 ab
T2 + T	106.88 ab
T2 + B+T	106.42 b
T2 + W	100.71 b
LSD (P=0.05)	33.569
CV (%)	18.17

¹ ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ต้น

² ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

B = *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 P = *Ps. spinosa*

T = *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T75 W = น้ำเปล่า

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลผลผลิตของต้นพริกหวานทางสถิติแบบ Randomized Complete Block design ภายหลังการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนาร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 เป็นระยะเวลา 3 เดือนภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	1055110	117234	1.18	0.3588
Error	20	1986827	99341		
Corrected Total	29	3041937			
CV(%)	25.32				

ตารางที่ 11 ผลผลิตของพริกหวานภายหลังการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนาร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 เป็นระยะเวลา 3 เดือนภายในโรงเรือนปลูกพริกหวาน

กรรมวิธี	น้ำหนักของพริกหวาน (กก.) ¹
T1 + B	1253.3 ab ²
T1 + P	1363.8 ab
T1 + T	1239.6 ab
T1 + B+T	830.55 b
T1 + W	1062.9 ab
T2 + B	1291.1 ab
T2 + P	1579.4 a
T2 + T	1175.8 ab
T2 + B+T	1310.8 ab
T2 + W	1342.5 ab
LSD (P=0.05)	536.82
CV (%)	25.32

¹ ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ต้น

² ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

B = *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20

P = *Pseudomonas spinosa*

T = *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T75

W = น้ำเปล่า