



วิทยานิพนธ์

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้
สกุลหวาย สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

APPLICATION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS
FOR THE CONTROL OF YELLOW LEAF BLOTCH ON
Dendrobium ORCHID CAUSED BY *Pseudocercospora dendrobii*

นางสาวกรพินธุ์ ทนกล้า

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย สาเหตุจากเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>
Application of Antagonistic Microorganisms for the Control of Yellow Leaf Blotch on <i>Dendrobium</i> Orchid Caused by <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	

นามผู้วิจัย นางสาวกรพินธุ์ ทนกล้า

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์จรูญเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 2 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย
สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

Application of Antagonistic Microorganisms for the Control of Yellow Leaf Blotch
on *Dendrobium* Orchid Caused by *Pseudocercospora dendrobii*

โดย

นางสาวกรพินธุ์ ทนกล้า

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2551

กรพินธุ์ ทนกล้า 2551: การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์จรูญเดช แจ่มสว่าง, Ph.D. 126 หน้า

จากการทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์รวม 10 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย ที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์ยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคได้ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TM04 และ CG06 สามารถลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในเรือนปลูกช่วงฤดูหนาวได้ 75.18 – 95.21% ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี mancozeb (80% WP) ที่ 1,200 ppm

การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และผสมหรือไม่ผสมกับสารละลายปุ๋ย และสารกำจัดแมลงศัตรูพืชในเรือนปลูก มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรค 31.75 – 77.06% ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยวทั้งที่ผสมและไม่ผสมกับสารละลายปุ๋ยและสารกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งลดการเกิดโรค 47.11 – 94.13%

การพ่นจุลินทรีย์ควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อโรคในเรือนปลูกช่วงฤดูฝน พบว่า ทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้ค้ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 มีประสิทธิภาพค้ำที่สุด ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และไม่พ่นเชื้อโรค ทุกกรรมวิธีสามารถป้องกันการเกิดโรคตามธรรมชาติได้ค้ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การตรวจสอบความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใบกล้วยไม้ทุกสัปดาห์ พบประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ปริมาณค้ำที่ค้ำนได้ใบมากกว่าค้ำนบนของใบ และตรวจพบจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 1 ตารางเซนติเมตรของเชื้อรา *P. dendrobii* น้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อสาเหตุโรคนอกจากนี้ตรวจพบว่าทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ช่วยส่งเสริมให้จำนวนช่อ ความยาวช่อ และจำนวนดอกต่อช่อของคอกกล้วยไม้ ตลอดจนความยาวรากและจำนวนรากเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อโรค เมื่อตรวจสอบ specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ในใบยอดของกล้วยไม้ต่อการเกิดโรคใบปื้นเหลืองที่ 0 - 10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ก่อนพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* 24 ชม. พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ทุกวัน โดยกรรมวิธีที่ใช้สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ CG06 สร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มสูงขึ้น ผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า การพ่น *T. harzianum* หรือ *Bacillus* spp. สามารถควบคุมโรคใบปื้นเหลืองได้ทั้งโดยตรงด้วยการยับยั้งและลดปริมาณเชื้อโรค และโดยอ้อมด้วยการกระตุ้นให้พืชเกิดความค้ำต้านทานโรค

กรพินธุ์ ทนกล้า.

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

26 / พค. / 51

Korapin Thonkla 2008: Application of Antagonistic Microorganisms for the Control of Yellow Leaf Blotch on *Dendrobium* Orchid Caused by *Pseudocercospora dendrobii*. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Chiradej Chamswarn, Ph.D. 126 pages.

Efficacy test of 10 strains of antagonistic microorganisms for the control of yellow leaf blotch (YLB) on *Dendrobium* orchid caused by *Pseudocercospora dendrobii* revealed that all strains inhibited spore germination and suppressed mycelial growth of the pathogen. *Trichoderma harzianum* strains CB-Pin-01 and T50 and *Bacillus* spp. TM04 and CG06 effectively reduced YLB on *Dendrobium* orchid grown in saran house during cold season by 60.20 – 95.21 %. These efficacies were comparable to the use of 1,200 ppm mancozeb.

T. harzianum combined with *Bacillus* spp., mixed or non-mixed with foliar fertilizer and insecticide reduced YLB on *Dendrobium* orchid by 31.75 – 77.06%. This disease reduction was non significantly different as compared to the solely use of *T. harzianum* or *Bacillus* spp., either mixed or non-mixed with foliar fertilizer and insecticide.

During rainy season, spraying on pathogen inoculated *Dendrobium* orchid grown in saran house with antagonistic microorganisms revealed that *T. harzianum* strains CB-Pin-01 and T50 obviously reduced severity of YLB as compared to a control. All treatments sprayed with antagonistic microorganisms on naturally infected orchids effectively suppressed YLB when compared with an unsprayed control. Surviving populations of *T. harzianum* and *Bacillus* spp. recovered from under leaf surface were higher than from upper leaf surface of *Dendrobium* orchid. Numbers of *P. dendrobii* spore /1 cm² of leaf area on antagonist treated orchids were lower detected when compared with the numbers derived from pathogen inoculated control. In addition, all treatments sprayed with antagonistic microorganisms promoted the higher number of inflorescence, length of inflorescence, number of flower per inflorescence as well as length and number of roots when compared with the pathogen inoculated control. Study on specific activity of β -1,3-glucanase and chitinase in shoot of orchid in relation to YLB during 0-10 days after spraying of antagonistic microorganisms, 24 hr. prior to the spray of *P. dendrobii* indicated the daily changes of those enzymes. Isolate CB-Pin-01 and CG06 caused the increases of enzymes β -1,3-glucanase and chitinase . This study suggested that spraying *T. harzianum* or *Bacillus* spp. could control YLB directly through the inhibition and reduction of pathogen as well as indirectly through the induction of disease resistance in orchid.

Korapin Thonkla.

Student's signature

Chiradej Chamswarn

Thesis Advisor's signature

26 / 05 / 08

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การดำเนินชีวิต และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์
กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. วรรณวิไล อินทนู กรรมการวิชาเอก ที่กรุณาให้คำปรึกษา กำลังใจและ
แนะแนวทางในการทดลองมาโดยตลอด กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม
กรรมการวิชารอง และ ผศ. ดร. ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้
คำแนะนำ ตรวจสอบ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีเนื้อหาที่ครบถ้วนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน และน้อง ๆ แห่งห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ และ
เจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสนทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ
เอื้อเฟื้อ และเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณแม่จาร์นิต์ ทนกล้า คุณเจริญศรี เกียรตินันท์ เป็นอย่างสูง ที่เป็นแรง
บันดาลใจให้ศึกษาต่อในครั้งนี้ คอยให้ความอบอุ่นและความเข้าใจ ขอขอบคุณน้องมุกตภา ทนกล้า ที่
เป็นแรงกระตุ้นในการทำงานและให้กำลังใจในยามท้อแท้เสมอมา

ขอขอบคุณ คุณกิตติ เพื่อนบัวผัน ที่คอยแนะนำ และให้คำปรึกษาในการปลูกเลี้ยง การดูแล
กล้วยไม้เป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ครอบครัว อาจารย์ผู้
ประสพวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดมาจน
สำเร็จการศึกษา

กรพินธุ์ ทนกล้า

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	38
ผล	38
วิจารณ์	89
สรุปและข้อเสนอแนะ	99
สรุป	99
ข้อเสนอแนะ	101
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	102
ภาคผนวก	115
ภาคผนวก ก	116
ภาคผนวก ข	120
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	126

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนาเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	40
2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนาเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	41
3	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	44
4	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	45
5	ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน (การทดลองครั้งที่ 1 : พ.ย. – ธ.ค. 49)	48
6	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ที่ผิวค้ำบนใบ และค้ำใต้ใบของกล้วยไม้เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปแล้ว 5 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 1 : พ.ย. – ธ.ค. 49)	51
7	ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน ในการทดลองครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50) ภายใต้สภาพเรือนปลูกกล้วยไม้	55
8	การยับยั้งเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture	59
9	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ที่ผิวค้ำบนใบ และค้ำใต้ใบของกล้วยไม้เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปแล้ว 5 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 2 : มี.ค. – เม.ย. 50)	62
10	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> ที่ผิวค้ำใต้ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 5 ครั้ง ไปแล้ว 1 สัปดาห์ (การทดลองครั้งที่ 2)	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน ในการทดลองครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค. 50)	67
12	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> ที่ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสัปดาห์ จำนวน 10 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)	72
13	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CG06) ที่ผิวด้านบนใบ และด้านใต้ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 10 ไปแล้ว 1 สัปดาห์ (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)	73
14	ปริมาณประชากรของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CG06) ในน้ำที่บีบออกมาจากกาบมะพร้าวที่ใช้เป็นวัสดุปลูก 10 กรัม เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)	75
15	เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CG06) หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 10) เป็นเวลา 1 สัปดาห์	76
16	ผลผลิตของดอกกล้วยไม้ หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CG06) และร่วมหรือไม่ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)	79
17	ความยาวราก จำนวนรากต่อต้น และจำนวนรากใหม่ต่อต้นของกล้วยไม้ หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CG06) และร่วมหรือไม่ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)	81

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ลักษณะ โคลนีของเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> บนอาหาร SMA modified เมื่ออายุ 20 วัน	38
2	อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ในรูปเซลล์แขวนลอย (CG06) สารกรอง (CG30) สารกรองของเชื้อราปฏิชีวนะ <i>Trichoderma harzianum</i> (T50) และสารเคมีเบนโนมิล (benomyl) ในการยับยั้งการงอกและการพัฒนาของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	42
3	อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในรูปสารกรองเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> สายพันธุ์ CG06 และ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ TM04 และสารกรองของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>	46
4	ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิชีวนะ <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. (TM04) และ <i>B. cereus</i> (WS16) ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ สาเหตุจากเชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i> หลังจากพ่นเชื้อโรค 35 วันเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control)	49
5	โคลนีของเชื้อราปฏิชีวนะ <i>Trichoderma</i> spp. (CB-Pin-01, T 50, DU-07, TV-16 และ TL-01) และเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>Bacillus</i> spp. (CG06 และ TM04) ที่ได้มาจากผิวด้านบนและด้านใต้ใบของกล้วยไม้ เมื่อใช้วิธี dilution spread plate บนอาหาร	52
6	อาการของโรคใบปื้นเหลืองบนกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการพ่นเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในสภาพเรือนปลูกครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50) หลังจากพ่นเชื้อโรค 35 วัน	58
7	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. (CG06 และ TM04) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคใบเน่าเหี่ยวของกล้วยไม้ ในเรือนปลูก ครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค. 50)	70
9	การเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่เจริญครอบครองรากส่วนต่างๆของกล้วยไม้ หลังจากล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hypochlorite แล้ววางบนอาหารจำเพาะ	77
10	ความยาวช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลาย ปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช	83
11	ความยาวราก จำนวนราก หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช	84
12	ปริมาณเอนไซม์ β -1,3-glucanase (U/mg protein) ที่ใบยอดกล้วยไม้สร้างขึ้นในช่วง 0-10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	86
13	ปริมาณเอนไซม์ chitinase (U/mg protein) ที่ใบยอดกล้วยไม้สร้างขึ้นในช่วง 0-10วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	88
ภาพผนวกที่		
1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)	122
2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)	124
3	กราฟแสดงมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)	125

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance)
BSA	=	Bovine Serum Albumine
CFU	=	จำนวนโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony forming unit)
cm	=	เซนติเมตร (centimeter)
Conc	=	Concentration
M	=	โมลาร์ (Molar)
mg	=	มิลลิกรัม (milligram)
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
NAG	=	N-acetyl glucosamine
NGA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose agar)
NGB	=	อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose broth)
nm	=	นาโนเมตร (nanometer)
O.D.	=	ค่าโอดี (Optical Density)
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)
Pd	=	เชื้อรา <i>Pseudocercospora dendrobii</i>
PR – protein	=	pathogenesis-related protein
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
SMA	=	synthetic mucor agar
T	=	เชื้อรา <i>Trichoderma</i>
U	=	unit/mg protein
V	=	ปริมาตร (volume)
W	=	น้ำหนัก (weight)
WA	=	water agar
μg	=	ไมโครกรัม (microgram)
°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย
สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

**Application of Antagonistic Microorganisms for the Control of Yellow Leaf Blotch
on *Dendrobium* Orchid Caused by *Pseudocercospora dendrobii***

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งนับเป็นพืชที่มีดอกกลุ่มใหญ่ที่สุด (สมศักดิ์, 2540) มีอยู่ประมาณ 15,000 ถึง 25,000 ชนิด (species) มีการแพร่กระจายทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในประเทศเขตร้อน ในประเทศไทยพบกล้วยไม้ประมาณ 500 สกุล (genus) 800 ชนิด (จิตรพรพรรณ, 2536, 2542) อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก จากข้อมูลกรมศุลกากร พบว่ามูลค่าการส่งออกของกล้วยไม้ในปี 2547 มีประมาณ 2,480.6 ล้านบาท ประเทศที่นำเข้าลูกกล้วยไม้จากประเทศไทยมากที่สุด คือ ประเทศญี่ปุ่น กล้วยไม้ได้รับความนิยมาอย่าง ต่อเนื่องทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากมีลักษณะดอกและสีอันลวดลายสวยงาม เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ประดับจึงมีจุดขายอยู่ที่ความสวยงาม ในกรณีที่ขายทั้งต้น ความสวยงามของลำต้น ใบและดอกเป็นสิ่งจำเป็น ถ้าขายเป็นไม้ตัดดอก ผู้ซื้อจะคำนึงถึงความสวยงาม เฉพาะช่อดอกและดอก ดังนั้น โรค แมลงรวมทั้งสิ่งอื่น ๆ ที่ทำลาย สร้างตำหนิ หรือยับยั้งการเจริญเติบโตต่อต้นกล้วยไม้ก็ถือว่าเป็นศัตรูของกล้วยไม้ โดยเฉพาะปัญหาด้านโรคพืช จะไปมีผลทำให้ผลผลิตและคุณภาพของกล้วยไม้ลดลง เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตกล้วยไม้เพื่อให้ได้คุณภาพตามที่ตลาดต้องการและเพื่อการส่งออก ซึ่งโรคที่สำคัญและพบว่าทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้ในหลายสกุล คือ โรคใบปื้นเหลือง (Yellow leaf blotch or *Pseudocercospora* leaf spot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (พัฒนา และคณะ, 2542 ; นิยมรัฐ, 2542 ; กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2544) โดยในประเทศไทยพบในกล้วยไม้ได้เกือบทุกสกุล โดยเฉพาะสกุลหวาย ลักษณะอาการที่ปรากฏให้เห็น คือ ใบจะมีจุดกลมสีเหลือง เมื่อเป็นมากๆ จะขยายติดต่อกัน เป็นปื้นเหลืองตามแนวยาวของใบ เมื่อพลิกดูใต้ใบจะเห็นเป็นกลุ่มผงสีดำ ในที่สุดใบที่เป็นรุนแรง

จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ พร้อมทั้งร่วงหลุดออกจากต้นในที่สุด ทำให้ต้นกล้วยไม้ทั้งใบหมด ไม่มีใบสังเคราะห์แสง ส่งผลให้การแตกหน่อใหม่ไม่สมบูรณ์ ช่อดอกน้อย ผลผลิตลดลงกว่าปกติ เกษตรกรป้องกันโดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชจำพวกคาร์เบนดาซิม เบโนมิล แมนโคเซบเข้ามาใช้ แต่เนื่องจากสารเคมีไปมีผลทำให้เชื้อเกิดความต้านทานหรือไปทำลายสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีประโยชน์จึงทำให้โรคมมีการระบาดเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการตื่นตัวต่อการลดการใช้สารเคมีกันมากขึ้น เนื่องจากผู้ผลิตและผู้บริโภคเริ่มตระหนักถึงพิษภัยที่เกิดจากสารเคมีตกค้างในผลิตผลและเป็นการทำลายสภาพแวดล้อม รวมทั้งการกีดกันทางการค้าจากประเทศคู่ค้า โดยอ้างถึงผลิตผลที่มีสารเคมีตกค้าง ทำให้การปลูกพืชในระบบต่าง ๆ ที่ใช้สารเคมีน้อยจนถึงไม่ใช้เลยเป็นที่นิยมปฏิบัติมากขึ้น เช่น การผลิตพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ หรือระบบการผลิตพืชแบบปลอดสารพิษ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เป็นศัตรูต่อเชื้อโรค นับเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและเชื่อว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี ทั้งนี้พบว่ามีเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้บางกลุ่มได้ปฏิบัติกันอย่างกว้างขวางเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

นักวิจัยและนักวิชาการทางด้านการเกษตรหลายท่านได้ทำการศึกษาค้นคว้า พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. และ *Bacillus subtilis* (Papavizas, 1985; จิระเดช และวรรณวิไล, 2544) สามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. และ *Fusarium* spp. เป็นต้น (จิระเดช และวรรณวิไล, 2546) ดังนั้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ก็เป็นอีกทางเลือกที่ควรมีการศึกษา เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ทดแทนหรือช่วยลดการใช้สารเคมีในการลดความเสียหายที่เกิดจากโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวายและช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ถ้าจุลินทรีย์สามารถอยู่รอดและเจริญแพร่กระจายบนเครื่องปลูกหรือในเรือนกล้วยไม้ได้ดี จะช่วยให้สามารถควบคุมหรือลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ และเรือนปลูกกล้วยไม้
2. เพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกแล้ว ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ ในเรือนปลูกกล้วยไม้
3. เพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ ในเรือนปลูกกล้วยไม้
4. เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ ในเรือนปลูกกล้วยไม้

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะและความสำคัญของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นไม้ส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท และมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี (ที่มา : ฐานข้อมูลพืช กรมวิชาการเกษตร) ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้เมืองร้อน สามารถส่งออกได้เป็นอันดับ 1 ของโลก และมีศักยภาพที่จะขยายตลาดเพิ่มขึ้นได้ในอนาคต เนื่องจากปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้มีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี จึงทำให้พื้นที่ในการเพาะปลูกเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยในปี 2545 ประเทศไทยพื้นที่เพาะปลูกกล้วยไม้ ประมาณ 15,000 ไร่ และเพิ่มขึ้นเป็น 19,500 ไร่ ในปี 2547 (ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร)

กล้วยไม้เป็นพืชหลายฤดู อยู่ในจำพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ลักษณะการเจริญเติบโตแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ประเภทเจริญเติบโตขึ้นไปทางยอด (monopodial) ได้แก่ สกุลแวนด้า (Vanda) ม็อคคาร่า (Mokara) และประเภทการเจริญเติบโตแบบแตกกอ หรือเหง้า (sympodial) ได้แก่ สกุลหวาย (Dendrobium) แคทลียา (Cattleya) ออนซิเดียม (Oncidium) เป็นต้น (ที่มา : ฐานข้อมูลพืช กรมวิชาการเกษตร) โดยทั่วไปลำต้นของกล้วยไม้ไม่มีแก่นและเปลือก เนื้อในเสมอกัน ลำต้นมี 2 ลักษณะ คือ ลำต้นแท้ มีข้อและปล้องเหมือนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป มีการเจริญเติบโตทางยอด ลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วยไว้สะสมอาหาร มีลำต้นเป็นเหง้า มีข้อและปล้องถี่ เจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก รากกลมอวบเป็นเส้นเล็กแข็งหรือแบนราบ มีทั้งรากดิน รากกิ่งดิน รากกิ่งอากาศ และรากอากาศ ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะต่างกันออกไป เช่น รูปแถบ รูปกลมยาว หรือลดรูปเป็นเพียงเกล็ด แผ่นใบบางคล้ายใบหมาก หนาอวบน้ำ หรือเป็นแท่งกลม ส่วนมากแล้วไม่มีส่วนที่เป็นก้านใบชัดเจน สีของใบเป็นสีเขียวสด บางชนิดเป็นสีม่วงคล้ำ บางชนิดก็มีลวดลาย ดอกออกที่ปลายลำต้น ซอกใบหรือข้างลำต้น ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบเรียงสลับกันกับกลีบดอก 3 กลีบ กลีบดอกอันล่างมีลักษณะต่างออกไปเรียกว่า กลีบปากหรือกลีบกระเปาะไว้สำหรับล่อแมลง ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมียเชื่อมติดกันกับเกสรตัวผู้เป็นไส้เกสรอยู่กลางดอก เกสรตัวผู้อยู่รวมกันเป็นก้อนเป็นกลุ่มเรณู แต่ละอับเรณูมีฝาปิด มี 2, 4 หรือ 8 ก้อนแล้วแต่ชนิดกล้วยไม้ ยอดเกสรตัวเมียอยู่ใต้อับเรณู มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว รั้งไข้อยู่ตรงส่วนของก้านดอก เมื่อได้รับการผสมจะเจริญไปเป็นเมล็ดต่อไป เมล็ดมีจำนวน

มากในแต่ละฝัก เมล็ดมีขนาดเล็กมาก ภายในเปลือกหุ้มมีคัพภะ (embryo) ที่ยังไม่มีการเจริญเติบโต และไม่มีอาหารสะสม (endosperm) (จิตรพรพรรณ, 2542)

2. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

กล้วยไม้ต้องการสภาพแวดล้อมที่ดี เช่น อากาศถ่ายเทได้สะดวก ใกล้เคียงแหล่งน้ำที่มีปริมาณเพียงพอตลอดฤดูปลูกและน้ำมีคุณภาพดี มี pH ประมาณ 5.2 – 6.2 ปริมาณน้ำฝนต่อปี ไม่เกิน 1,200 มิลลิเมตร แสงร้อยละ 40 – 60 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 – 35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยตลอดปี 50 – 70 เปอร์เซ็นต์ (ที่มา : ฐานข้อมูลพืช กรมวิชาการเกษตร) การคมนาคมขนส่งสะดวก สามารถนำผลผลิตออกสู่ตลาดได้รวดเร็ว

3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* Deighton.

โรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้ มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* Deighton. เป็นราใน Subdivision Deuteromycotina ซึ่งเป็นราพวก imperfect fungi ขยายพันธุ์โดยการสร้างโคนิเดีย (conidia) ลักษณะเป็นเส้นเรียวยาว ปลายมน มีผนังกัน (septum) แบ่งออกเป็นหลายเซลล์ และเกิดบนก้าน conidiophore (Deighton, 1987) ซึ่งอกติดกันเป็นกระจุกที่บริเวณแผลด้านใต้ใบ

Sontirat *et al.* (1980) รายงานว่า *P. dendrobii* ที่พบในประเทศไทยนั้น ลักษณะของก้าน conidiophore จะมีสีน้ำตาลปนสีเขียวมะกอก มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) โดยจะพบทั้งที่มีลักษณะที่ตั้งตรง หรือโค้งงอ มีการแตกกิ่งก้านสาขา ที่ conidiophore และพบ septum ประมาณ 1 – 7 septum conidiophore มีความกว้างประมาณ 4 – 6 ไมครอน ยาวประมาณ 25 – 75 ไมครอน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tzen *et al.* (1992) ที่พบว่า ลักษณะของ conidiophore มีสีเข้มน รูปร่างเป็นทรงกระบอก เช่นเดียวกับที่พบในประเทศไทย conidiophore มีประมาณ 4 – 9 septum กว้างประมาณ 2.5 – 6 ไมครอน และยาวประมาณ 12 – 68 ไมครอน

ลักษณะของ conidium ไม่มีสี หรือสีใส ตั้งตรง หรือโค้งงอเล็กน้อย ที่ปลายของ conidium จะมน กลม scar ไม่ชัดเจน หรือแทบจะมองไม่เห็นเลย ที่ conidium พบประมาณ 1 – 7 septum กว้างประมาณ 2 – 3.5 ไมครอน และยาวประมาณ 16 – 69 ไมครอน

รายงานวิจัยส่วนมากเป็นการศึกษาศรีวิทยาของเชื้อรา *P. dendrobii* เพื่อจะได้รู้จักและสามารถหาทางควบคุมและป้องกันกำจัดได้ต่อไป เนื่องด้วยในปัจจุบันมีหลายประเทศที่มีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะประเทศแถบเอเชีย Tzen *et al.* (1992) ทำการทดสอบพบว่า เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* สามารถเจริญและงอกได้ดีที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ก็พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เส้นใยของเชื้อราเจริญดีที่สุด คือ mucor agar medium และ potato dextrose broth medium ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เส้นใยเจริญได้น้อยที่สุดคือ sugarcane leaf decoction medium และ CMC medium นอกจากนี้ยังมีการทดลอง พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Cercospora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8[®] juice agar สามารถชักนำให้เชื้อราสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ดีอีกด้วย (El-Gholl , 1982)

4. ความสำคัญของโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้

โรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้เป็น โรคที่พบเสมอในสวนกล้วยไม้โดยเฉพาะประเทศแถบเอเชีย ในประเทศไทยพบว่าสามารถเกิดในกล้วยไม้ได้เกือบทุกสกุล โดยเฉพาะสกุลหวาย (นิยมรัฐ, 2542) นอกจากนี้ยังพบการแพร่ระบาดของโรคนี้ในกล้วยไม้สกุลหวายที่หมู่เกาะฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกาอีกด้วย (Uchida, 1994) โดยโรคจะแพร่ระบาดรุนแรงและรวดเร็วในช่วงปลายฤดูฝนที่มีฝนตกชุกไปจนถึงต้นฤดูหนาว (นิยมรัฐ, 2542 ; กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2544)

5. ลักษณะอาการของโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ *Pseudocercospora dendrobii*

เชื้อสาเหตุมักเข้าทำลายที่ใบแก่ หรือใบที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมากกว่าใบอ่อน อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีเหลืองทั้งด้านบนใบและใต้ใบ จุดเหลืองนี้จะค่อย ๆ แผ่กว้างออกไปเป็นวงกลมใหญ่ หรือปื้นสีเหลือง ในขณะที่อากาศมีความชื้นสูงหรือฝนตกชุก เชื้อราจะเจริญเป็นกระจุกเล็กๆ สีน้ำตาลอมเทา และเกิดเป็นกลุ่มอยู่บนสีเหลืองนั้น ถ้าอากาศแห้งด้านท้องใบจะมีเนื้อเยื่อเป็นจุดละเอียด สีน้ำตาลเข้มอยู่รวมเป็นกลุ่มใหญ่ อาจพบอาการเนื้อเยื่อแห้งตายในวงกลมสีเหลือง จำนวนแผลบนใบมีไม่จำกัด ใบที่เกิดวงแผลสีเหลืองมากจะร่วงก่อนกำหนด แต่โดยทั่วไปจะติดอยู่กับต้นจนกว่าใบจะแก่และร่วงไปเอง ถ้าเป็นโรครุนแรงต้นกล้วยไม้จะทิ้งใบหมด ทำให้ไม่มีใบสังเคราะห์แสง ทำหน้าที่สังเคราะห์อาหารให้แก่พืช (นิยมรัฐ, 2544)

โรคนี้อีกมักเกิดกับต้นที่มีสีเขียวเข้มผิดปกติ และใบที่เป็นโรคนี้อีกมักเป็นใบของลำลูกกล้วย หลัง ๆ ซึ่งอยู่ในระยะที่ไม่ค่อยเจริญเติบโตแล้ว แต่ยังมีหน้าที่สังเคราะห์อาหารให้แก่พืชอยู่ เพื่อช่วยให้ลำลูกกล้วยส่วนหน้าเจริญเติบโตได้เต็มที่ รังกล้วยไม้ที่มีใบสีเขียวเข้มมากๆ มักจะเป็นรังที่มีการให้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดมากเกินไป ทำให้เครื่องปลูกมีสภาพเป็นกรดไปด้วย ซึ่งเป็นผลให้ปริมาณธาตุฟอสฟอรัส หรือธาตุอาหารอื่นๆ อีกหลายธาตุละลายออกมาให้พืชใช้ประโยชน์ได้น้อยลง ทำให้กล้วยไม้แสดงอาการขาดธาตุอาหาร ใบสีเขียวเข้มผิดปกติ กล้วยไม้ดอกออกช้า ช่อดอกน้อย ระบบรากไม่เจริญเติบโต การแตกหน่อใหม่ไม่สมบูรณ์ ผลผลิตลดลงกว่าปกติ กล้วยไม้ อาจทรุดโทรม จนถึงตายได้ในที่สุด

6. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

โรคนี้อาจพัฒนาได้ดีหากมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือนสูงกว่า 70 % (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) และช่วงเวลาที่ใบเปียก ขึ้นนานเพียงพอ หากผิวใบได้รับความชื้นจากน้ำค้าง ฝน และหมอก จะเป็นปัจจัยที่เหมาะสมในการเข้าทำลายมาก โดยหากช่วงเวลาที่ใบได้รับความชื้นมากขึ้น ก็จะเพิ่มอัตราความรุนแรงของโรค เพราะฉะนั้น โรคนี้อาจพบระบาดมากตั้งแต่ปลายฤดูฝนจนถึงฤดูหนาว อากาศเย็นแห้ง ลมพัดถ่ายเทมากกว่าปกติ การแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุจะเกิดขึ้นได้โดยโคนิเดียของเชื้อราแพร่กระจายไปกับลม หรือการสาดกระเซ็นของน้ำฝน หรือกระเด็นไปกับละอองน้ำที่ใช้รดต้นกล้วยไม้ หรือติดไปกับแมลง มนุษย์ สัตว์ และเครื่องมือการเกษตร เมื่อโคนิเดียตกลงบนพืช และมีสิ่งแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายพืชได้

7. การป้องกันกำจัดโรค

7.1 การป้องกันกำจัดโรคโดยวิธีทางกายภาพ

การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ที่ถูกต้องนั้น ไม่ควรปล่อยให้กล้วยไม้เป็นโรคแล้วจึงรักษาในภายหลัง ซึ่งจะเป็นสิ่งที่กระทำได้ยาก ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยอาศัยการจัดการสภาพแวดล้อม และการปฏิบัติที่ถูกต้องของเกษตรกรตามมาตรฐานการผลิตกล้วยไม้อย่างถูกต้อง และเหมาะสม (กรมวิชาการเกษตร, 2542) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. เก็บรวบรวมใบที่เป็น โรคบนเครื่องปลูกและพื้นโรงเรือนกล้วยไม้ โดยเฉพาะใต้โต๊ะกล้วยไม้ไปเผาทำลาย เพื่อเป็นการกำจัดเชื้อและลดปริมาณของเชื้อในสวนให้เหลือน้อยที่สุด การเก็บรวบรวมใบที่เป็นโรคไปกองตามโคนต้นไม้ที่อยู่ในบริเวณสวนกล้วยไม้ จะทำให้เกิดแหล่งสะสมเชื้อให้ระบาดตลอดเวลา (นิมรัฐ, 2542 ; กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2544)

2. จัดการระบายอากาศในโรงเรือนกล้วยไม้ให้ดี เพื่อลดความชื้น ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

3. ระวังเรื่องการขาดธาตุอาหารต่างๆ ในกล้วยไม้ เพราะอาจทำให้กล้วยไม้อ่อนแอ ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

4. ขจัดปัญหาเรื่องเครื่องปลูกที่มีฤทธิ์เป็นกรดมากเกินไป เช่น ให้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดน้อย และควรชะล้างเครื่องปลูก 1-2 ครั้งต่อเดือน หรือใช้น้ำยา $CaCl_2$ เข้มข้น รดให้ชุ่มเครื่องปลูก 2-3 เดือนต่อครั้ง ก็จะช่วยแก้ฤทธิ์กรดได้

7.2 การป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้สารเคมี

นิมรัฐ (2542) และ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา (2544) รายงานว่า โรคใบเป็นเหลืองสามารถควบคุมได้โดยพ่นด้วยสารป้องกันและกำจัดโรคพืช ได้แก่

- ประเภทคูดซิม คือสารในกลุ่มคาร์เบนดาซิม อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือเบนโนมิล อัตรา 10 – 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

- ประเภทสั้มผัส คือสารในกลุ่มแมนโคเซบ หรือ แมนโคเซบร่วมกับคาร์เบนดาซิม โดยฉีดพ่นสารให้ถูกกับเนื้อที่ใต้ผิวใบซึ่งมีโคนเดียวของเชื้อให้มากที่สุด

โดยควรพ่นให้ทั่วทั้งบนใบและใต้ใบ ทุกๆ 7 – 10 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เกษตรกรควรใช้ด้วยความระมัดระวังและคำนึงถึงความปลอดภัยต่อตัวผู้ใช้และผลผลิตที่ปลอดภัยจากสารพิษ

Tzen *et al.* (1992) รายงานว่า การใช้สารเคมี คลอโรธาโลนิล และคาร์เบนดาซิม ร่วมกับไดโซนอล สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้สารเคมีในกลุ่ม

ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สเตอรอยด์ (ergosterol biosynthesis inhibitors ; EBIs) สารเคมีกำจัดโรคพืชเบโนมิล และสารเคมีกำจัดโรคพืชประเภทสัมผัส ก็สามารถลดการเกิดโรคใบเป็นเหลืองได้เช่นกัน โดยการใช้สารพวก EBIs เพียงอย่างเดียวหรือผสมร่วมกับสารเคมีชนิดอื่น ก็สามารถลดการเกิดโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้ในเรือนปลูกทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมีเบโนมิล เพียงชนิดเดียว (McIvor, 1990.)

7.3 การป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราชั้นสูงที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (Papavizas, 1985) สามารถมีชีวิตรอดในสภาพธรรมชาติได้ดี โดยอาศัยอาหารจากอินทรีย์วัตถุ เศษซากพืชและเชื้อโรค เชื้อรา *Trichoderma* มีการเจริญสร้างเส้นใยสีขาวได้อย่างรวดเร็ว มีผนังเซลล์ (septate hyphae) ผนังเส้นใยเรียบมีการแตกกิ่งก้านมากมาย (Rifai, 1969) และสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างสปอร์สีเขียวได้เป็นจำนวนมาก *Trichoderma* บางชนิดทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปหรือมีการสร้างกลิ่น เช่น กลิ่นมะพร้าว (ลาวัลย์และคณะ, 2540)

ปัจจุบันเชื้อรา *T. harzianum* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมและป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืช (biocontrol agent) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด (Harman, 2000) เชื้อรา *T. harzianum* สามารถพบได้ทั่วไปในดินและระบบรากพืช สามารถแยกเชื้อนี้ได้จากดิน เศษซากพืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและเนื้อแข็ง รวมทั้งส่วนต่างๆ ของพืชได้ง่าย (Chaverri *et al.*, 2003; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004) สามารถจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อรา *T. harzianum* ได้ดังนี้

การจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แบบไม่อาศัยเพศ (Papavizas, 1985)

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Subdivision Deuteromycotina

Class Hyphomycetes

Order Moniliales, Hyphales

Family Moniliaceae

Genus *Trichoderma*

Species *Trichoderma harzianum*

เชื้อรา *T. harzianum* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphs) โดยการสร้างสปอร์ปริมาณมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี มีตั้งแต่ไม่มีสี, สีเหลืองอ่อน, สีเหลือง (yellow), สีน้ำตาลเหลือง (amber), สีเหลืองอมเขียว (yellow-green) และเขียว (green) บางสายพันธุ์ผลิต chlamyospore ระหว่างเส้นใยหรือปลายเส้นใย และเป็นโครงสร้างที่ช่วยให้เชื้อสามารถอยู่ในดินได้นาน ส่วนระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) ของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai จัดอยู่ใน Order Hypocreales Family Hypocreaceae Genus *Hypocrea* ซึ่งเชื้อรา *T. harzianum* สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Hypocrea lixii* ที่มีการสร้าง ascospore (Papavizas, 1985; Chaverri *et al.*, 2003; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004) เชื้อรา *Trichoderma* spp. หลายสายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์ที่เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ส่วนมากไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยในธรรมชาติจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น มาจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. รวมถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนั้น ได้แก่ การเป็นปรสิตภายในของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasitism), การแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่กับเชื้อโรคพืช (competition and rhizosphere competence), การสร้างปฏิชีวนสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช (antibiosis), การส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพเครียด (tolerance to biotic and abiotic stresses through enhanced root development), การช่วยละลายธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ (solubilization and sequestration of inorganic plant nutrients), และการชักนำความต้านทานในพืช (induced resistance) รวมทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช (plant growth promoting) (Harman, 2000) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การเป็นปรสิต เป็นกลไกในการควบคุมโรคพืชโดยที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญไปพันรัดเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคแล้วย่อยสลายผนังเซลล์ เพื่อเจริญเข้าไปใช้อาหารภายใน โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phytophthora* และ *Colletotrichum* เป็นต้น (จิระเดช และ วรณวิไล, 2546) จากนั้นส่วนขยายพันธุ์สามารถเจริญออกมาจากเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ จนเป็นเหตุให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแตกสลายหรือเหี่ยวแห้ง (lysis) และตายในที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ผลิตขึ้นมา เพื่อช่วยในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค เช่น chitinase หรือ chitinolytic enzyme, β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, peptaibol antibiotics (Elad *et al.*, 1983; Harman, 2000; Howell, 2003)

รายงานของ Weindling (1932) ได้แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* เข้าไปใกล้เส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* แล้วเจริญพันรัดเส้นใย สัมผัสแนบชิดและเจริญเข้าสู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* ทำให้เส้นใยสูญเสียความมีชีวิต บางครั้งพบว่า เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ได้สัมผัสกับเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่สามารถทำให้โปรโตพลาสซึมสูญเสียคุณสมบัติได้ แสดงให้เห็นถึงลักษณะอื่นนอกเหนือจากการเป็นปรสิตโดยไม่ต้องมีการสัมผัสของเส้นใย สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางส่วนที่พบว่าถูกเชื้อรา *Trichoderma* เข้าทำลายโดยวิธีการเป็นปรสิตประกอบด้วย *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Endothia*, *Venturia*, *Diaporthe* และ *Fusicladium*

2. การแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ เป็นลักษณะการแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยได้รวดเร็ว และสามารถสร้างสปอร์ได้ในปริมาณสูงมาก โดยอาศัยอาหารจากเศษวัสดุต่าง ๆ จึงช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกันได้ เช่น ในกรณีที่เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญครอบครองรากหอม และทำลายเชื้อสาเหตุโรค คือ เชื้อรา *Sclerotium cepivorum* ได้ (Danielson and Davey, 1973; Howell, 2003) และในกรณีของ Hubbard *et al.* (1983) ที่พบว่าในดินมีธาตุเหล็กต่ำ อันเป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเรืองแสง คือ fluorescent pseudomonads ได้จับยึดแร่เหล็กที่เป็นประโยชน์ด้วยสารซิเดอโรฟออร์ (siderophores) ส่งผลให้ความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมโรคพืชลดลงด้วย ความชื้นของดินก็มีบทบาทต่อการเจริญและการ

แข่งขันของเชื้อรา *Trichoderma* มาก ในบางกรณีพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ไม่อาจสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไปในดิน (soil microflora) ได้ จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้มากพอที่จะไปทำหน้าที่ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช แต่เมื่อใดก็ตามที่จุลินทรีย์ในดิน หรือเชื้อโรคถูกกระทำหรือถูกรบกวนด้วยปัจจัยบางประการจนเกิดความอ่อนแอหรือมีปริมาณลดลงเชื้อรา *Trichoderma* จะสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น การใช้คาร์บอนไดซัลไฟด์ และเมทิลโบรไมด์ ซึ่งเป็นสารกำจัดสิ่งมีชีวิตในดิน ส่งผลให้เชื้อรา *Armillaria mellea* อ่อนแอลง ระยะเวลาจึงเป็นช่วงที่เหมาะสมแก่เชื้อรา *T. viride* ซึ่งมีความทนทานต่อสารเคมีดังกล่าว ในการเข้าแก่งแย่งอาหารและทำลายเชื้อรา *A. mellea* ช่วยให้โรครากเน่าลดลง

3. การสร้างปฏิชีวนสาร เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารเคมี ซึ่งอาจเป็นปฏิชีวนสาร (antibiotics) สารพิษ หรือเอนไซม์ (extracellular enzymes) เพื่อมายับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยหรือยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* บางชนิด หรือบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารประกอบที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตสารดังกล่าวได้หลายชนิด อาทิเช่น สารไตรโคเดอร์มิน (Trichodermin) (Godtfredsen and Vangedal, 1965) สารเดอร์มาดีน (dermadine) เป็นสารพวก unsaturated monobasic acid ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Pyke and Dietz, 1966) สารซุกคาซิลลิน (Suzukacillin) และอะลามเมทิซิน (Alamethicine) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Meyer and Reusser, 1967; Ooka *et al.*, 1996; Reusser, 1967) สารอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) (Dennis and Webster, 1971) สารไตรโคลิน (Tricholin) (Lin *et al.*, 1994) และสารไตรโคซิเนียนีนส์ (Trichozinianines) (Correa, 1995)

Intana *et al.* (2003) ยังพบว่า *T. harzianum* สายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) สามารถสร้าง pentyl pyrone และ oxazole ได้ และนอกจากนี้ Cerato *et al.* (2003) พบว่า เชื้อรา *T. hamatum*, *T. longibrachiatum* และ *T. koningii* มีความสามารถในการสร้างปฏิชีวนสารได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถลดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Cercospora beticola* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์โคสปอรา ในต้น sugar beet ได้โดย ไม่มีความแตกต่างจากการใช้สารเคมี

4. การยับยั้งเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์ เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งซึ่งช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ รวมทั้งเชื้อโรคพืชในการใช้อาหาร ตลอดจนช่วยในการเข้าทำลายเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์ไลติก (lytic enzymes) เอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) ที่มีบทบาทในการทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *S. rolfii* ที่ระดับ pH เป็นกลาง (Rodriguez-Kabana, 1969; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1968, 1978) เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic extracellular enzymes) สามารถช่วยให้เกิดการย่อยผนังเส้นใยของเชื้อโรคนั้นเป็นช่อง ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* เจริญเข้าไปได้ (Geremia *et al.*, 1991) เอนไซม์เปคโตไลติก (pectolytic enzyme) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Anju, 1994) ไคตินเนส (chitinase) กลูคานเนส (glucanase) และเซลลูโลส (cellulases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นมาตรงบริเวณที่เชื้อรา *T. harzianum* เกาะติดหรือพันรัดอยู่บนเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfii*, *Pythium aphanidermatum* และ *R. solani* (Elad *et al.*, 1983; Intana *et al.*, 2003) ดังนั้นการเติมไคติน (chitin) ให้กับเชื้อรา *T. harzianum* จึงพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium* spp. และ *R. solani* ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลผลิตมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อรา *Trichoderma* ที่เพิ่มขึ้น (Harman *et al.*, 1981) อย่างไรก็ตามมีรายงานที่บ่งชี้ว่า *Trichoderma* สายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคพืชกลับไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ก็ได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อรา *Trichoderma* ขึ้นอยู่กับการร่วมกันของกิจกรรมการสร้างปฏิชีวนสารและเอนไซม์ (จิระเดช, 2549)

5. การช่วยให้พืชมีความทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ช่วยให้พืชมีความทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมทั้งทาง biotic และ abiotic stresses เช่น ช่วยให้พืชทนแล้ง ทนต่อแมลงและโรค โดยส่งเสริมการพัฒนาระบบราก เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ fusant T-22 ซึ่งสามารถเจริญครอบครองรากพืชได้ ทำให้พืชที่ทดสอบในสภาพแห้งแล้ง (drought stress) มีความยาวของรากเพิ่มขึ้นและยับยั้งอาการม้วนงอของใบได้ (Harman, 2000)

6. การช่วยละลายแร่ธาตุในดิน เชื้อรา *T. harzianum* สามารถช่วยละลายแร่ธาตุในดินที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถดูดซึมได้ ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมแล้วนำไปใช้ได้ โดยเฉพาะธาตุแมงกานีสที่มีบทบาทต่อการเจริญของพืชและกระบวนการต้านทานต่อโรคในพืช ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ได้คือ Mn^{2+} และส่งเสริมการใช้แร่ธาตุในพืชชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น ส่งเสริมการใช้ธาตุไนโตรเจน, rock phosphate, Zn metal (Zn^0), Mn^{4+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , โดยที่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ fusant T-22 ผลิตสารที่ลดการ oxidize ของไอออน และผลิต siderophores ที่เป็นตัว chelate ไอออนได้

7. การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช นอกจากเชื้อรา *T. harzianum* จะเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช สามารถป้องกันและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แล้วยังมีคุณสมบัติในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ด้วยการสร้าง PR-protein (pathogenesis related protein) (Harman *et al.*, 2004a) เช่นเชื้อรา *T. harzianum* สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม glucanohydrolase ที่จัดเป็น PR-protein ดังนั้นการชักนำการสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase โดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจและมีความปลอดภัยกับต้นพืช เนื่องจากเอนไซม์ β -1,3-glucanase มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ β -1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด หากใช้เชื้อรา *T. harzianum* แล้วจะสามารถชักนำให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase ได้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการป้องกันการบุกรุกเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้ และทำให้ผลผลิตไม่เสียหายมากนัก (Benhamou, 1992)

การศึกษากการชักนำความต้านทานที่ให้ผลอย่างชัดเจนเป็นครั้งแรกคือในปี ค.ศ. 1997 โดย Bigirimana *et al.* ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 ใส่ลงดินสามารถชักนำความต้านทานต่อโรคบนใบของถั่วที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* ได้ เพราะตรวจพบเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 เฉพาะบริเวณรากไม่พบในส่วนของใบ เชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำความต้านทานในพืชได้ทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว (Harman *et al.*, 2004a) นอกจากนี้ De Meyer *et al.* (1998) รายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* T39 สามารถควบคุมเชื้อรา *B. cinerea* ได้ หลังจากที่ใช้เชื้อรา T39 ไปแล้ว 7 วัน สามารถชักนำให้พืชหลายชนิดเช่น มะเขือเทศ ผักกาดหอม พริก ถั่วพีและยาสูบ ต้านทานต่อเชื้อ *B. cinerea* ด้วยการลดอาการโรค grey mold ลงถึง 25-100% รวมทั้งชะลอหรือยับยั้งการแพร่กระจายของโรคได้

Yedidia *et al.* (1999) อธิบายว่า *T. harzianum* T-203 มีศักยภาพในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ ตรวจสอบได้โดยการปลูกเชื้อ *T. harzianum* ที่รากของต้นอ่อนแตงกวาใน aseptic hydroponic system ผลการตรวจสอบพบว่าพืชที่ใส่ *T. harzianum* มีการพัฒนามากกว่าพืชที่ไม่ได้ใส่ *T. harzianum* ตลอดการทดลอง และในปี 2003 Intana ได้รายงานถึงผลิตผลของเชื้อรา *Trichoderma* (culture filtrate) ซึ่งหมายถึงสารกรองที่สามารถกระตุ้นให้ต้นแตงกวาด้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช (*Pythium irregulare*) ได้

8. การส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืชได้ มีผู้รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารไปกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตมากกว่าปกติ หรือเกิดจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถไปทำลายเชื้อโรคบริเวณรอบ ๆ ราก แล้วทำให้ระบบรากพืชแข็งแรง ไม่มีการรบกวนจากเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จึงทำให้พืชเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่มีการรบกวนจากเชื้อสาเหตุโรค ดังเช่น ในรายงานของ Harman (2000) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-22 สามารถเจริญครอบครองราก และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน และเพิ่มผลผลิตของพริกหวานได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ Intana (2003) รายงานไว้ว่า พบสาร pentyl pyrone และ hexazone ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มผลผลิตของแตงกวาได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ในธรรมชาติสามารถพบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชได้ ซึ่งมีการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เรียกแบคทีเรียเหล่านี้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) หรือเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) เชื้อปฏิปักษ์นี้มีกลไกควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ 4 ลักษณะ (นิพนธ์, 2546) ดังนี้

1. การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช (Competition) แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และสามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ได้ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น สำหรับในแง่ของการแข่งขันที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญ ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* ผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก (Iron, Fe^{+3}) ในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี (Schippers *et al.*, 1987) ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้น ซึ่งนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะแบบนี้ว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียนี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizosphere)

2. การสร้างปฏิชีวนสาร (Antibiosis) เชื้อแบคทีเรียที่เรียกเป็นเชื้อที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะที่หลากหลายมากที่สุด แบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้รับความสนใจคัดเอามาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น มักจะมีคุณสมบัติที่สามารถทำลายชีวิตของเชื้อโรคโดยการผลิตปฏิชีวนสารเป็นส่วนใหญ่ และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่ได้นำศึกษา แบคทีเรียปฏิชีวนะสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่นำมาผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน นอกจากนี้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกก็อาศัยกลไกชนิดนี้ คือ การควบคุมโรค crown gall โดยแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ที่ผลิตสาร bacteriocin ชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรคและ ช่วยป้องกันการเกิดโรคกับต้นพืชได้ นอกจากนี้ยังเป็นจุลินทรีย์ปฏิชีวนะสำหรับควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่มีการผลิต จำหน่ายเป็นครั้งแรกในหลายประเทศทั่วโลก (Thomson, 1987; Penyalver *et al.*, 2000) หรือในกรณีของการใช้ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylate สามารถยับยั้งการเกิดโรค Take-all ของข้าวสาลีได้ถึง 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Cook, 1993)

3. การเป็นปรสิต (Parasitism) ในปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบไม่มากนัก และการใช้เพื่อควบคุมโรคพืชก็ยังไม่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ *Ewinia urediniolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม (rust) *Bdellovibrio bacteriovorus* เป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (syn. *Bacillus penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) แบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจัง จึงนับว่าเป็นสิ่งหนึ่งที่น่าศึกษาพัฒนานำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชต่อไป

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance) เป็นกลไกที่สนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อรา หรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไปแล้ว สามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ ตัวอย่างเช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพวกแตง (cucurbit) ไม่ทำให้พืชเกิดโรค แต่เจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง

(avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

เนื่องจากงานวิจัยเพื่อควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมาก จึงมีข้อเสนอแนะว่าควรจะมีการศึกษาค้นคว้าและวิจัยให้มากยิ่งขึ้นเพื่อที่จะได้ลดความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการใช้สารเคมีและที่สำคัญยังเป็นการลดต้นทุนในการปลูกเลี้ยงและผลิตกล้วยไม้อีกด้วย ส่วนใหญ่เป็นการใช้จุลินทรีย์ประยุกต์เพื่อการควบคุมโรคของพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น จิระเดช (2546) ได้รายงานว่ามีเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสเตรปโตไมซีตพันธุ์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 และ T152 พันธุ์ลงบนวัสดุปลูกไร้ดินและบนต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวม 5 ครั้ง หลังจากพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (ครั้งที่ 5) หรือสารเคมีแมนโคเซบครบ 24 ชั่วโมง จึงพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* สาเหตุโรคราใบดำของมะเขือเทศ ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ 50.62, 62.74 และ 37.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

พรามาต (2550) รายงานว่า การควบคุมโรคราใบดำของมะเขือเทศในช่วงฤดูหนาวด้วยการแช่เมล็ด พัน และ/หรือรดด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ทุกสัปดาห์จนครบ 3 สัปดาห์ จึงพ่นเชื้อรา *P. fuligena* ในการทดลองนี้มีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วย จากการประเมินโรค พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้ จุลินทรีย์ปฏิสัมพันธ์สามารถลดอาการโรคราใบดำของมะเขือเทศได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมการแช่เมล็ด พัน และ/หรือรดจุลินทรีย์ปฏิสัมพันธ์สามารถลดโรคได้เท่าเทียมกัน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TM04 และ TM04-2 (rif) สามารถลดอาการโรคลงได้มากถึง 46.26 - 50.22 %

Lartey and Caesar (2003) รายงานว่า การใช้เชื้อรา *Laetisaria arvalis*, *T. harzianum*, *T. aureoviride* และ *T. virens*. สามารถควบคุมเชื้อรา *C. beticola* ได้ โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะผลิตสารพิษหรือเข้าไปพันรัดเชื้อราสาเหตุโรค (Caesar, 2003) เมื่อทำการทดสอบในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบ สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่ในดินได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาโดยการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *C. beticola* สาเหตุโรคใบจุดเซอร์โคสปอรา ของต้น sugar beet ได้เช่นเดียวกัน

Koreten *et al.*, (1997) แสดงให้เห็นว่า จากการทดลองที่ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 ปี พบว่าการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* ร่วมกับสารเคมีคอปเปอร์ออกซิคโลไรด์, สารเคมีเบนโนมิล หรือการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เพียงชนิดเดียว ในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต สามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรค Black spot บนผล Avocado สาเหตุจาก *Pseudocercospora purpurea* ลงได้ โดยการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ในช่วงปีแรกของการทดลองพบว่า การใช้สารเคมีควบคุมโรคสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด แต่ในปีต่อมา การใช้สารเคมีร่วมกับแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพมากขึ้น และในช่วงปีสุดท้ายของการทดลอง พบว่า การใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เพียงชนิดเดียวก็สามารถควบคุมและลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด ซึ่ง Koreten ได้สรุปไว้ว่า การใช้จุลินทรีย์ปฏิบัติในการควบคุมโรคพืชนั้นจะประสบความสำเร็จได้ ต้องใช้เวลาและมีการใช้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเป็นการลดการใช้สารเคมี และลดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ใช้ในห้องปฏิบัติการและในโรงเรียน

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. ตันกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ธงชัยโกลด์ | 8. Shaker |
| 2. Petri dishes | 9. Spectrophotometer/Cuvette |
| 3. Tubes | 10. Foggy |
| 4. Pipette/Tips | 11. Streptomycin |
| 5. Haemocytometer | 12. Lactophenol acid fuchsin |
| 6. Depression slide | 13. Compound microscope |
| 7. Centrifuge | 14. Autoclave |

ใช้ในการวัดเอนไซม์

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. โกร่งบดตัวอย่างพืช | 7. สารละลาย Nelson's reagent |
| 2. 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 | 8. สารละลาย N-acetylglucosamine |
| 3. สารละลาย alkaline copper | 9. hot plate |
| 4. สารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent | 10. water bath |
| 5. สารละลาย Bovin serum albumin (BSA) | 11. colloidal chitin |
| 6. สารละลาย copper reagent | 12. laminarin |

วิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคใบเป็นเหลืองมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดใบพืชบริเวณที่เป็นโรคให้คาบเกี่ยวกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แช่ชิ้นพืชใน clorox 10% (0.525% sodium hypochlorite) เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำชิ้นใบพืชไปวางบนอาหาร water agar (WA) 2% โดยวางในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 4 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งมีเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นพืช ตัดชิ้นวัฏบริเวณขอบโคโลนีมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) synthetic mucor agar (SMA) (Tzen *et al.*, 1992) V-8[®] juice agar (El-Gholl, 1982) เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติภัณฑ์ที่ใช้ทดสอบ

สำหรับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ปฏิบัติภัณฑ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง และ ผศ. ดร. วรณวิไล อินทนู ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ได้แก่

เชื้อราปฏิบัติภัณฑ์

1. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (บรรเจิด และจิระเดช, 2529)
2. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-50 (Intana, 2003)
3. เชื้อรา *Trichoderma virens* สายพันธุ์ TV16 (Ridthaisong, 2005)
4. เชื้อรา *Trichoderma pseudokoningii* สายพันธุ์ DU-07 (วารุณี, 2546)
5. เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* สายพันธุ์ TL-01 (วารุณี, 2546)

เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ B03 (สุณีรัตน์, 2540)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 (วารภรณ์, 2544)
3. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG30 (วารภรณ์, 2544)
4. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ WS16 (วารภรณ์, 2545)
5. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 (พรวามาสและคณะ, 2547)

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (cfu/ml) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A 600 nm) ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 และเตรียมสารกรอง (culture filtrate) โดยการนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียเข้มข้น 10^8 cfu/ml ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

ส่วนกรณีเชื้อราปฏิชีวนะ เตรียมโดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเจาะเป็นวงกลมที่ขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ก่อนนำชิ้นส่วนของเชื้อดังกล่าวจำนวน 5 ชิ้น ไปเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิชีวนะ โดยการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T-50 เชื้อรา *T. virens* ไอโซเลท TV16 เชื้อรา *T. pseudokoningii* ไอโซเลท DU-07 และ เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลท TL-01 บนข้าวสุกเป็นเวลา 7 วันตามวิธีการของจิระเดชและวรรณวิไล (2545) จากนั้นนำข้าวสุกที่ได้มาเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย โดยการล้างข้าวที่มีเชื้อราด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตรและกรองเอาเฉพาะน้ำสปอร์เพื่อเตรียมเป็นสปอร์แขวน ลอย และเตรียมสารกรอง (culture filtrate) ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดสดที่เลี้ยงบนข้าว โดยชั่งเชื้อสดในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร (เชื้อสด 1 กรัมต่อน้ำ 100

มิลลิลิตร) แช่ไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อนนำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

3. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิบัติกรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Pseudocercospora dendrobii ในระดับห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากเชื้อรา *P. dendrobii* เจริญช้ามาก จึงคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิบัติกรสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งการงอกและการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* แล้วจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. dendrobii* ได้ดี เพื่อนำไปทดสอบในเรือนปลูกทดลองต่อไป

3.1 การยับยั้งการงอกของสปอร์

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* จากใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรค ใบป็นเหลือง ปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้ได้ 10^4 โคนิเดียต่อมิลลิลิตรด้วย haemocytometer

หยดเซลล์แขวนลอย หรือสารกรองของจุลินทรีย์ปฏิบัติกรที่เตรียมโดยวิธีการเดียวกับในข้อ 2 ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงในสไลด์หลุม (depression slide) หลังจากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* ปริมาตรเท่ากันลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในกล่องพลาสติกขึ้น หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นำสไลด์มาข้อมด้วยสี acid fushin ก่อนนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกของโคนิเดีย และวัดความยาวของ germ tube โดยนับ 10 สปอร์ต่อสไลด์ทำ 4 ซ้ำ ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นมาเชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิบัติกร (Frevel and Spurr, 1977) เปรียบเทียบกับสารเคมีแมนโคเซบ (80% WP) ที่ 1,200 ppm

3.2 การยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใย

หอยคสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* ลงบนสไลด์หลุม บ่มเชื้อในสภาพเดียวกันกับการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ หลังจากนั้น 18 ชั่วโมง นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกเป็น germ tube แล้วจึงหอยเซลล์แขวน ลอย หรือสารกรองของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไป บ่มเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาข้อมด้วยสี acid fushin ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการเจริญของเส้นใยโดยนับ 10 สปอร์ต่อสไลด์ ทำ 4 ซ้ำ ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เปรียบเทียบกับสารเคมีแมนโคเซบ (80% WP) ที่ 1,200 ppm

4. การทดสอบความสามารถและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือนครั้งที่ 1 (พ.ย. – ธ.ค. 49)

4.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* จากใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคใบปื้นเหลือง โดยใช้ฟุ้งกันจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ชับให้แห้ง ปิดสปอร์ของเชื้อราบริเวณใต้ใบลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้ได้ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วย haemocytometer

4.2 การเตรียมสปอร์ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (cfu/ml) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A 600 nm) ให้มีค่าเท่ากับ 0.2

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนข้าวสุกเป็นเวลา 7 วันตามวิธีการของจิระเดชและวรรณวิไล (2545) จากนั้นนำข้าวสุกที่ได้ (เชื้อสด) มาเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย โดยล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อในอัตราเชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร (ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และกรองเอาเฉพาะน้ำสปอร์มาใช้

4.3 การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

เตรียมสารเคมีแมนโคเซบ (80% WP) อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

เตรียมสารเคมีเบนโนมิล (80% WP) อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

4.4 การปฏิบัติ

เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชัชโกลด์ ซึ่งปลูกในเรือนปลูกกล้วยไม้ที่คลุมด้วยหลังคาพลาสติกใสทับด้วยตาข่ายสีดำพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบโดยพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่วทั้งต้นแล้วปล่อยให้แห้ง กรอบต้นกล้วยไม้ที่ปลูกในกระถาง ด้วยถุงพลาสติกใส ขนาด 12 x18 นิ้ว พ่นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อโรคทางปลายถุงที่เปิดไว้ทางโคนต้น ด้วยเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมตามกรรมวิธีข้างต้น (ความเข้มข้น 10^8 เซลล์หรือสปอร์ต่อมิลลิลิตร และเติมสารจับใบก่อนพ่น) พ่นลงบนใบในช่วงเย็น ปิดช่องเปิดปลายถุงโดยใช้เชือกมัด แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง กรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยกำหนดกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อรา *T. virens* (TV16)

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *T. pseudokoningii* (DU-07)

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อรา *T. longibrachiatum* (TL-01)

กรรมวิธีที่ 6 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* (B03)

กรรมวิธีที่ 7 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* (WS16)

กรรมวิธีที่ 9 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06)

กรรมวิธีที่ 10 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG30)

กรรมวิธีที่ 11 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ร่วมกับ สารเคมี mancozeb

กรรมวิธีที่ 12 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) ที่เตรียมโดยเชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร

กรรมวิธีที่ 13 พ่นสารเคมี mancozeb อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) (600 ppm)

กรรมวิธีที่ 14 พ่นสารเคมี mancozeb (1,200 ppm)

กรรมวิธีที่ 15 พ่นสารเคมี benomyl (600 ppm)

กรรมวิธีที่ 16 control พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* อย่างเดียว (+Pd)

กรรมวิธีที่ 17 control พ่นน้ำเปล่า (-Pd)

พ่นใบกล้วยไม้ด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ความเข้มข้น 10^4 โคนิเดีย / มิลลิลิตร แล้วปิดปากถุงพลาสติก เพื่อเพิ่มสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืน ก่อนนำถุงออก แล้วจึงพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรคทุกสัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 5 ครั้ง การทดสอบบนต้นกล้วยไม้ประกอบด้วย 17 กรรมวิธีข้างต้น กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ใบ

4.5 การประเมินการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย

ประเมินการเกิดโรคบนใบกล้วยไม้ 2 ครั้ง โดยประเมิน 5 ใบในแต่ละต้น เริ่มตั้งแต่ใบยอดจนถึงใบล่างใบที่ 5 ครั้งที่ 1 ประเมินอาการที่เกิดขึ้นบนใบเมื่อครบ 21 วันหลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก และครั้งที่ 2 เมื่อครบ 35 วันหลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก สังเกตการพัฒนา และความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

การทดสอบบนใบกล้วยไม้ กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ใบ โดยใช้เกณฑ์ประเมินระดับการเกิดโรค ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 แสดงอาการของโรค 1-20% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 2 แสดงอาการของโรค 21-40% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 แสดงอาการของโรค 41-60% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 แสดงอาการของโรค 61-80% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 แสดงอาการของโรค 81-100% ของพื้นที่ใบ

นำค่าการประเมินที่ได้ไปคำนวณค่าดัชนีการเกิดโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนใบที่แสดงอาการ x ระดับอาการ)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด x ระดับอาการสูงสุด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

4.6 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวใบกล้วยไม้

ตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวใบ โดยสุ่มใบกล้วยไม้ในแต่ละซ้ำของแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 4 ใบ เช็ดผิวใบของกล้วยไม้ทั้งด้านบน และด้านล่างของผิวใบ ด้วย cotton bud ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่ cotton bud ที่มีเช็ดติดอยู่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex นาน 3 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบที่ติดอยู่บน cotton bud หลุดลงมาอยู่ในน้ำ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น $10^{-1} - 10^{-5}$ เท่า จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูด suspension 0.1 มิลลิลิตร มาหยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Martin's medium และ NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ตรวจนับจำนวนโคโลนี คำนวณเป็นหน่วยโคโลนี (colony forming unit, CFU) ต่อพื้นที่ใบ 1 ตารางเซนติเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวายในสภาพโรงเรือนครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50)

5.1 การเตรียมเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

เช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2 การเตรียมสปอร์ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เช่นเดียวกับข้อ 4.2 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ CG06 และ TM04

5.3 การเตรียมปุ๋ย ธาตุอาหารเสริม และสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช

ในกรรมวิธีที่ 5 – 8 , 13 – 16 และกรรมวิธีที่ 22 นั้น จะผสมปุ๋ยทางใบ ธาตุอาหารเสริม และสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช รวมด้วย โดยใช้สารเคมีไพริดาเบน (pyridaben) ในอัตราส่วน 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตรเพื่อควบคุมไรแดง และสารเคมีไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) ในอัตราส่วน 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตรเพื่อควบคุมหนอนกระทู้ผัก

ผสมกับปุ๋ยทางใบ สูตร 15-15-30 ในอัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สลับกับปุ๋ยทางใบ สูตร 15-30-15 ในอัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ร่วมกับ ธาตุอาหารเสริมนิคสเปรย์ (Nicspray[®]) ในอัตรา 3 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และแคลเซียม-โบรอน ในอัตรา 10 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร โดยผสมกับ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ก่อนพ่นบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

5.4 การปฏิบัติ

เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชัชโชลด์ ซึ่งปลูกในเรือนปลูกกล้วยไม้ที่คลุมด้วยหลังคาพลาสติกใสทับด้วยตาข่ายสีดำพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบโดยการพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่วทั้งต้นแล้วปล่อยให้แห้ง ครอบต้นกล้วยไม้ที่ปลูกในกระถาง ด้วยถุงพลาสติกใส ขนาด 12 x18 นิ้ว พ่นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อโรคทางปลายถุงที่เปิดไว้ทางโคนต้น ด้วยเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (จากการทดลองที่ 4) ซึ่งปรับความเข้มข้นให้ได้ 10⁸ เซลล์หรือสปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารจับใบก่อนพ่น โดยพ่นลงบนใบในช่วงเย็น ปิดช่องเปิดปลายถุงโดยใช้เชือกมัด แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb พ่นด้วยอัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พ่นให้ทั่วบริเวณใบ โดยกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยกำหนดกรรมวิธีไว้ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)
- กรรมวิธีที่ 2 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50)
- กรรมวิธีที่ 3 ฟันเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06)
- กรรมวิธีที่ 4 ฟันเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04)
- กรรมวิธีที่ 5 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช
- กรรมวิธีที่ 6 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช
- กรรมวิธีที่ 7 ฟันเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช
- กรรมวิธีที่ 8 ฟันเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช
- กรรมวิธีที่ 9 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06)
- กรรมวิธีที่ 10 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06)
- กรรมวิธีที่ 11 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04)
- กรรมวิธีที่ 12 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04)
- กรรมวิธีที่ 13 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

กรรมวิธีที่ 14 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50) และเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

กรรมวิธีที่ 15 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

กรรมวิธีที่ 16 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (TM04) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

กรรมวิธีที่ 17 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) เตรียมโดยใช้เชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร

กรรมวิธีที่ 18 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50) อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) เตรียมโดยใช้เชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร

กรรมวิธีที่ 19 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1

กรรมวิธีที่ 20 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) อัตรา ½ Dose (เจือจางลง 1 เท่า) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1

กรรมวิธีที่ 21 พ่นสารเคมี mancozeb อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 22 พ่นสารเคมี mancozeb ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

กรรมวิธีที่ 23 control พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* อย่างเดียว (+Pd)

กรรมวิธีที่ 24 control พ่นน้ำเปล่า (-Pd)

หลังจากทิ้งไว้ให้ใบแห้ง 24 ชั่วโมง พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของ *P. dendrobii* ที่ความเข้มข้น 10^4 โคนิเดีย / มิลลิลิตร จากนั้นปิดปากถุงพลาสติก เพื่อเพิ่มสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืน ก่อนนำถุงออก ทำการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรคทุกสัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลา 5 ครั้ง โดยทดสอบบนต้นกล้วยไม้ประกอบด้วย 23 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ใบ

5.5 การประเมินการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย

เช่นเดียวกับข้อ 4.5

5.6 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* บนผิวใบกล้วยไม้

ตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* บนผิวใบกล้วยไม้ โดยสุ่มใบกล้วยไม้ในแต่ละซ้าของแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 4 ใบ เช็ดผิวใบของกล้วยไม้ทั้งด้านบน และด้านล่างของผิวใบ ด้วย cotton bud ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ cotton bud ที่มีเชื้อติดอยู่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex นาน 3 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบที่ติดอยู่บน cotton bud หลุดลงมาอยู่ในน้ำ ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้า ตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วย haemocytometer ทำซ้าละ 10 ครั้ง จึงนำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 1 ตารางเซนติเมตร (ดัดแปลงจาก Veloukas *et al.*, 2007)

5.7 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวใบกล้วยไม้

เช่นเดียวกับข้อ 4.6

6. ศึกษาการประยุกต์ใช้และความคงทนของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือนครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค 50)

6.1 การเตรียมเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

เช่นเดียวกับข้อ 4.1

6.2 การเตรียมสปอร์ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เช่นเดียวกับข้อ 4.2 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06

6.3 การเตรียมปุ๋ย ธาตุอาหารเสริม และสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช

ในกรรมวิธีที่ 4 – 6 และกรรมวิธีที่ 11 นั้นจะมีการผสมปุ๋ยทางใบ ธาตุอาหารเสริม และสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชรวมด้วย โดยใช้สารเคมีไพริดาเบน (pyridaben) ในอัตราส่วน 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตรเพื่อความคุมไรแดง

ผสมกับปุ๋ยทางใบ สูตร 15-30-15 ในอัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ร่วมกับ ธาตุอาหารเสริมนิคสเปรย์ (Nicspray[®]) ในอัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และแคลเซียม-โบรอน ในอัตรา 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร โดยผสมกับจุลินทรีย์ทดสอบตามกรรมวิธี ก่อนพ่นบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

6.4 การปฏิบัติ

เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชัชโชกลด์ ซึ่งปลูกในเรือนปลูกกล้วยไม้ที่คลุมด้วยหลังคาพลาสติกใสทับด้วยตาข่ายสีดำพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบโดยการพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ให้ทั่วทั้งต้นแล้วปล่อยให้แห้ง ขณะพ่นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อโรคใช้ถุงดำ ล้อมในแต่ละกรรมวิธีไว้ โดยการทดลองครั้งนี้จะไม่มีการห่อถุงพลาสติกทิ้งไว้เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรคเลย ด้วยเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (จากการทดลองที่ 4) ซึ่งปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 เซลล์หรือสปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารจับใบก่อนพ่น โดยพ่นลงบนใบในช่วงเย็น ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb พ่นด้วยอัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พ่นให้ทั่วบริเวณใบ และวัสดุปลูก โดยกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยกำหนดกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (T50) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และพ่น *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 5 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 6 ฟันเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 7 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 8 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (T50) และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 9 ฟันแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 10 ฟันสารเคมี mancozeb อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 11 ฟันสารเคมี mancozeb ร่วมกับปุ๋ยทางใบและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 12 ฟันสารเคมี mancozeb และฟัน *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 13 control ฟันเชื้อรา *P. dendrobii* อย่างเดียว (+Pd)

กรรมวิธีที่ 14 control ฟันน้ำเปล่า (-Pd)

หลังจากปล่อยให้ใบให้ใบแห้ง 24 ชั่วโมง ฟันด้วยสปอร์แขวนลอยของ *P. dendrobii* ที่ความเข้มข้น 10^4 โคนิเดีย / มิลลิลิตร โดยทำการพ่นจุลินทรีย์ปฏิบัติ และเชื้อสาเหตุโรคทุกสัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 10 ครั้ง ทดสอบบนต้นกล้วยไม้ประกอบด้วย 14 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ใบ

6.5 การประเมินการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย

เช่นเดียวกับข้อ 4.5

6.6 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* บนผิวใบกล้วยไม้

เช่นเดียวกับข้อ 5.6

6.7 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิบัติ

6.7.1 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิบัติบนผิวใบกล้วยไม้

เช่นเดียวกับข้อ 4.6

6.7.2 การตรวจเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก

ตรวจความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิบัติในการเจริญครอบครองราก โดยสุ่มเลือกต้นกล้วยไม้ 3 ต้น ต่อกรรมวิธี นำรากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วตัดรากกล้วยไม้ให้มีความยาวขึ้นละประมาณ 1 เซนติเมตร แบ่งเป็นส่วนโคนราก และส่วนปลายราก ล้างด้วย 0.525 % 1 % และ 1.5 % sodium hypochlorite ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางรากบนอาหาร Martin's medium และ NGA โดยวาง 5 รากต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ตรวจนับปริมาณ และส่วนของรากกล้วยไม้ที่มีจุลินทรีย์ปฏิบัติเจริญออกมา คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของจุลินทรีย์ปฏิบัติ

6.7.3 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิบัติในวัสดุปลูก

ตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิบัติในวัสดุปลูก (กาบมะพร้าว) โดยรดน้ำให้ชุ่ม เพื่อให้กาบมะพร้าวดูดซับน้ำได้เต็มที่ สุ่มเก็บวัสดุปลูก จากแต่ละซ้าแล้วรวมเข้าด้วยกัน กรรมวิธีละ 10 กรัม บีบน้ำในกาบมะพร้าวออกมาเพื่อตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ปฏิบัติที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี dilution spread plate method โดยใช้ น้ำที่บีบได้จากกาบมะพร้าว 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex ให้เข้ากัน เจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2} หรือ 10^{-4} เท่า โดยดูดสปอร์ แขนวนลอย 0.1 มิลลิลิตร มาหยดแล้วเกลี่ยบนอาหาร NGA และ Martin's medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนี คำนวณเป็นหน่วยโคโลนี (colony forming unit, CFU) ต่อน้ำที่ได้จากกาบมะพร้าว 1 มิลลิลิตร

6.8 การบันทึกลักษณะผลผลิตที่ได้ของกล้วยไม้

หลังเสร็จสิ้นการทดลอง บันทึกจำนวนช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ และความยาวช่อดอกกล้วยไม้ ความยาวราก และจำนวนรากต่อต้น

7. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบกล้วยไม้สกุลหวาย

7.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เช่นเดียวกับข้อ 4.1

7.2 การเตรียมสปอร์ และเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เช่นเดียวกับข้อ 4.2 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06

7.3 การปฏิบัติ

เช่นเดียวกับข้อ 4.4 โดยกำหนดกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) พร้อมกับฟันเชื้อรา *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 2 ฟันแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) พร้อมกับฟันเชื้อรา *P. dendrobii*

กรรมวิธีที่ 3 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อนฟันเชื้อรา *P. dendrobii* 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4 ฟันแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) ก่อนฟันเชื้อรา *P. dendrobii* 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 5 ฟันเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 6 ฟันแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* (CG06) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 7 ฟันเชื้อรา *P. dendrobii* อย่างเดียว (control+)

กรรมวิธีที่ 8 ฟันน้ำเปล่า (control-)

ทดสอบบนใบกล้วยไม่มีทั้งหมด 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ใบ เมื่อฟันเชื้อโรคไปแล้ว ปิดปากถุง เพื่อให้เกิดความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืนแล้วจึงนำถุงออกจากนั้นตัดใบกล้วยไม้ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในใบกล้วยไม้ทุกวัน โดยเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 10 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

เตรียมตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อเก็บตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบดในโกรงที่แช่เย็น โดยใช้ตัวอย่างใบ 0.5 กรัมต่อสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดจนละเอียด นำตัวอย่างที่บดแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase หรือเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดกิจกรรมต่อไป

7.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

เตรียม colloidal chitin เพื่อใช้เป็น substrate โดยการผสมน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออัตรา 0.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร ผสมส่วนใสของตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่ต้องการวิเคราะห์มา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร ในหลอด microtube นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย colloidal chitin ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เปิดฝา microtube ก่อนนำไปต้มบน hot plate อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้ว (อัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร) แล้วเติม copper acetate ($C_4H_6CuO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว นำไปปั่นด้วย vortex ก่อนต้มบน hot plate ในขณะที่น้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานโดย NAG เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 3) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Nelson, 1944)

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

7.5 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase

เตรียม laminarin เพื่อใช้เป็น substrate ด้วยการผสมน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออัตรา 0.075 กรัม ต่อ น้ำ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ก่อน ดูดส่วนใสของตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่ต้องการวิเคราะห์มา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 0.4 มิลลิลิตร ในหลอด microtube นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย laminarin ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วเปิดฝา microtube นำไปต้มบน hot plate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้ว (อัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร) แล้วเติม copper acetate ($C_4H_6CuO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว นำไปปั่นด้วย vortex แล้วต้มบน hot plate ในขณะที่น้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานในการคำนวณกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 2) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Nelson, 1944)

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1957)

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อที่ความเข้มข้น 1: 5 ใช้ pipette ควบคุมใส่ในหลอดแก้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย alkaline copper 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วเติมสารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 1) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

สถานที่ทำการทดลอง

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

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน ตุลาคม 2548 - ตุลาคม 2550

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การแยกเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ให้บริสุทธิ์

เมื่อแยกเชื้อจากใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ โรคด้วยวิธี tissue transplanting method พบว่าได้เชื้อราลักษณะเป็นโคโลนีสีดำ เส้นใยค่อนข้างละเอียด มีบริเวณสีเทาฟูอยู่บ้าง เจริญออกมาจากชิ้นใบกล้วยไม้ จึงตัดชิ้นวัฏบริเวณขอบโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหาร V-8 agar และ SMA เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน พบว่าโคโลนีของเชื้อรายังเจริญได้น้อยมาก ดังแสดงในภาพที่ 1 และพบว่าสร้างสปอร์ได้น้อยมากเช่นกัน



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* บนอาหาร SMA modified เมื่ออายุ 20 วัน

2. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 การยับยั้งการงอกของสปอร์

สารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาหลายสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อโรค (*P. dendrobii*) ได้แตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าสารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth ที่เจือจางลงจากปกติ 5 เท่า (1/5 PDB) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าสารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงบนข้าวสุก (ชนิดสด) เช่น สารกรองของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T 50 ที่เลี้ยงในอาหาร 1/5 PDB ยับยั้งการงอกได้สมบูรณ์ คือสามารถยับยั้งการเจริญของ germ tube ได้เท่ากับสารเคมีแมนโคเซบ ในขณะที่สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ชนิดสด ยับยั้งการงอกได้ต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1

เซลล์แขวนลอยและสารกรองของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อราได้แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ WS16 และ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 ยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่สารกรองของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยับยั้งการงอกได้ 92.42 และ 96.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่สารกรองของเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG30 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ได้ดีที่สุด โดยเท่าเทียมกับสารเคมีแมนโคเซบ และทำให้บริเวณหัวและท้ายสปอร์โป่งพองผิดปกติ ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนาเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

กรรมวิธี	ความยาว germ tube ^{1/} (µm)	การยับยั้งการงอก (%)	ลักษณะ germ tube
Control	62.95 a ^{4/}	0.00	germ tube เจริญได้ปกติ
CB-Pin-01 (CP) ^{2/}	4.05 f	93.57	germ tube พัฒนาช้า มีการแตกแขนงเล็กน้อย
CB-Pin-01 (CR) ^{3/}	32.22 c	48.82	germ tube เจริญช้ากว่าปกติเล็กน้อย
T50 (CP)	2.12 f	96.63	germ tube พัฒนาช้า มีการแตกแขนงเล็กน้อย
T50 (CR)	38.35 c	39.08	germ tube เจริญช้ากว่าปกติเล็กน้อย
TV16 (CP)	26.50 d	57.90	germ tube เจริญช้า แต่มีการแตกแขนงมาก
TV16 (CR)	49.77 b	20.94	germ tube เจริญช้ากว่าปกติเล็กน้อย
TL-01 (CP)	26.50 d	57.90	germ tube เจริญช้า แต่มีการแตกแขนงมาก
TL-01 (CR)	45.87 b	27.13	germ tube เจริญช้ากว่าปกติเล็กน้อย
DU-07 (CP)	24.65 d	60.84	germ tube เจริญช้า แต่มีการแตกแขนงมาก
DU-07 (CR)	37.45 c	40.51	germ tube เจริญช้ากว่าปกติเล็กน้อย
mancozeb (1,200 ppm)	0.00 f	100.00	-
benomyl (600 ppm)	0.00 f	100.00	-

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยความยาวของ germ tube ที่พัฒนาเป็นเส้นใย รวมทั้งแขนงของเส้นใยทั้งหมดที่งอกออกมาจากสปอร์ หลังจากหยดสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 24 ชั่วโมง

^{2/} สารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth ที่เจือจางลงจากปกติ 5 เท่า (1/5 PDB) (CP)

^{3/} สารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงบนข้าวสุก (ชนิดสด) อัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร (CR)

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนา เป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Pseudocercospora dendrobia*

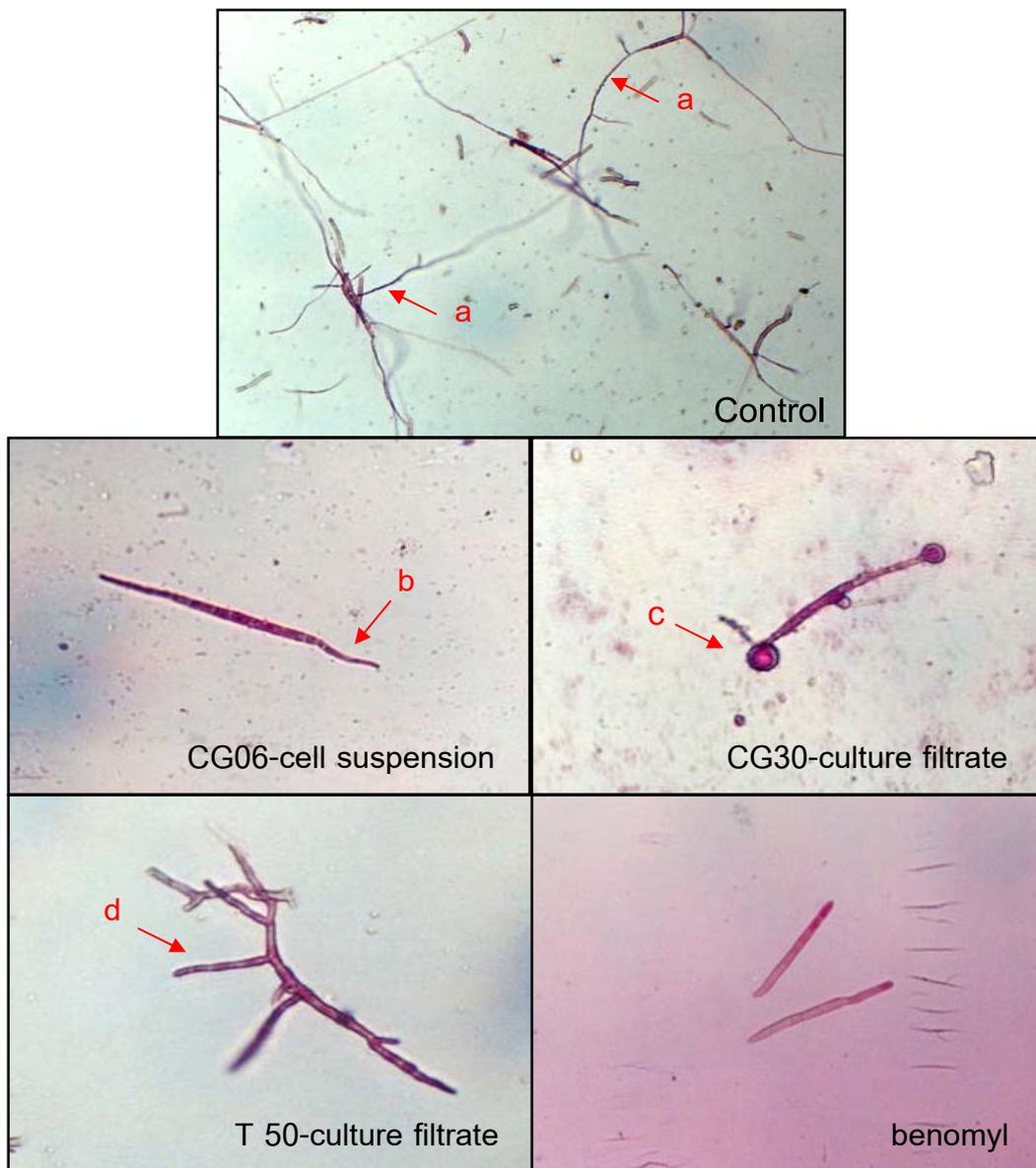
กรรมวิธี	ความยาว germ tube ^{1/} (µm)	การยับยั้งความงอก (%)	ลักษณะ germ tube
Control	62.95 a ^{4/}	0.00	สปอร์เจริญได้ตามปกติ
B03 (CS) ^{2/}	24.42 b	61.21	germ tube พัฒนาช้า
B03 (CF) ^{3/}	14.40 c	77.12	germ tube พัฒนาช้า
CG06 (CS)	0.85 e	98.65	germ tube พัฒนาช้า ส่วนมากไม่งอก
CG06 (CF)	2.30 de	96.35	germ tube พัฒนาช้า และสั้น
CG30 (CS)	1.77 de	97.19	พบบริเวณปลาย germ tube ทั้งที่งอก และไม่งอกโป่งพอง
CG30 (CF)	1.00 e	98.41	พบบริเวณปลาย germ tube ทั้งที่งอก และไม่งอกโป่งพองได้ทั้งด้านเดียว และสองด้าน
WS16 (CS)	0.55 e	99.13	germ tube พัฒนาช้า ส่วนมากไม่งอก
WS16 (CF)	4.77 d	92.42	germ tube พัฒนาช้า และสั้น
TM04 (CS)	2.50 de	96.03	พบบริเวณปลาย germ tube ทั้งที่งอก และไม่งอกโป่งพอง
TM04 (CF)	1.25 e	98.01	พบบริเวณปลาย germ tube ทั้งที่งอก และไม่งอกโป่งพองได้ทั้งด้านเดียว และสองด้าน
mancozeb (1,200 ppm)	0.00 e	100.00	-
benomyl (600 ppm)	0.00 e	100.00	-

หมายเหตุ^{1/} ค่าเฉลี่ยความยาวของ germ tube ที่พัฒนาเป็นเส้นใย รวมทั้งแขนงของเส้นใยทั้งหมดที่งอกออกมาจากสปอร์ หลังจากหยุดการงอกของเซลล์ของแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง

^{2/} เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (CS)

^{3/} สารกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (CF)

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 2 อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* ในรูปเซลล์แขวนลอย (CG06) สารกรอง (CG30) สารกรองของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (T50) และสารเคมีเบนโนมิด (Benomyl) ในการยับยั้งการงอกและการพัฒนาของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*
 a. สปอร์งอกปกติ, b. germ tube สั้น, c. สปอร์โป่งพอง, d. สปอร์แตกแขนง

2.1 การยับยั้งการเจริญของเส้นใย

สารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาหลายสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *P. dendrobii* ได้ใกล้เคียงกัน จากการทดลองพบว่าสารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth ที่เจือจางลงจากปกติ 5 เท่า (1/5 PDB) สามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยได้ดีกว่าสารกรองของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงบนข้าวสุก (ชนิดสด) โดยสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T 50 ที่เลี้ยงในอาหาร 1/5 PDB สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เท่าเทียมกับสารเคมีแมนโคเซบและดีกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ชนิดสด ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารกรองของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์อื่นแบบชนิดสด ดังแสดงในตารางที่ 3

เซลล์แขวนลอยและสารกรองของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *P. dendrobii* ได้แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TM04 และ *B. cereus* สายพันธุ์ WS16 ยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยได้ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ในขณะที่สารกรองของเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG30 และ CG06 ยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยได้ดี หรือเทียบเท่าการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังทำให้บริเวณตรงปลาย หรือกลางเส้นใยไปงพองผิดปกติ ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobia*

กรรมวิธี	ความยาวของเส้นใย (μm) ^{1/}	การยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใย (%)	ลักษณะการเจริญของเส้นใย
Control	656.45 a ^{4/}	0.00	เส้นใยเจริญดี
CB-Pin-01 (CP) ^{2/}	214.75 e	67.29	เส้นใยเจริญช้า มีการแตกแขนงมาก
CB-Pin-01 (CR) ^{3/}	598.43 ab	8.84	เส้นใยเจริญปกติแต่เจริญช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม
T50 (CP)	126.50 f	80.73	เส้นใยเจริญช้า มีการแตกแขนงมาก
T50 (CR)	532.33 c	18.91	เส้นใยเจริญปกติแต่เจริญช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม
TV16 (CP)	338.50 d	48.43	เส้นใยเจริญช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม
TV16 (CR)	642.18 a	2.17	เส้นใยเจริญดี
TL-01 (CP)	254.25 fg	61.27	เส้นใยเจริญช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม
TL-01 (CR)	614.38 a	6.41	เส้นใยเจริญดี
DU-07 (CP)	342.50 d	47.83	ปลายเส้นใยของบางสปอร์โป่งพอง
DU-07 (CR)	546.40 bc	16.76	เส้นใยเจริญปกติแต่เจริญช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม
mancozeb (1,200 ppm)	196.85 e	41.85	เส้นใยเจริญช้า
benomyl (600 ppm)	87.38 f	86.39	-

หมายเหตุ^{1/} ความยาวของเส้นใยคำนวณได้จากความยาวของเส้นใยทั้งหมดที่เจริญและแตกแขนงออกมาจากสปอร์ของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobia*

^{2/} สารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth ที่เจือจางลงจากปกติ 5 เท่า (1/5 PDB) (CP)

^{3/} สารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงบนข้าวสุก (ชนิดสด) อัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร (CR)

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *Pseudocercospora dendrobia*

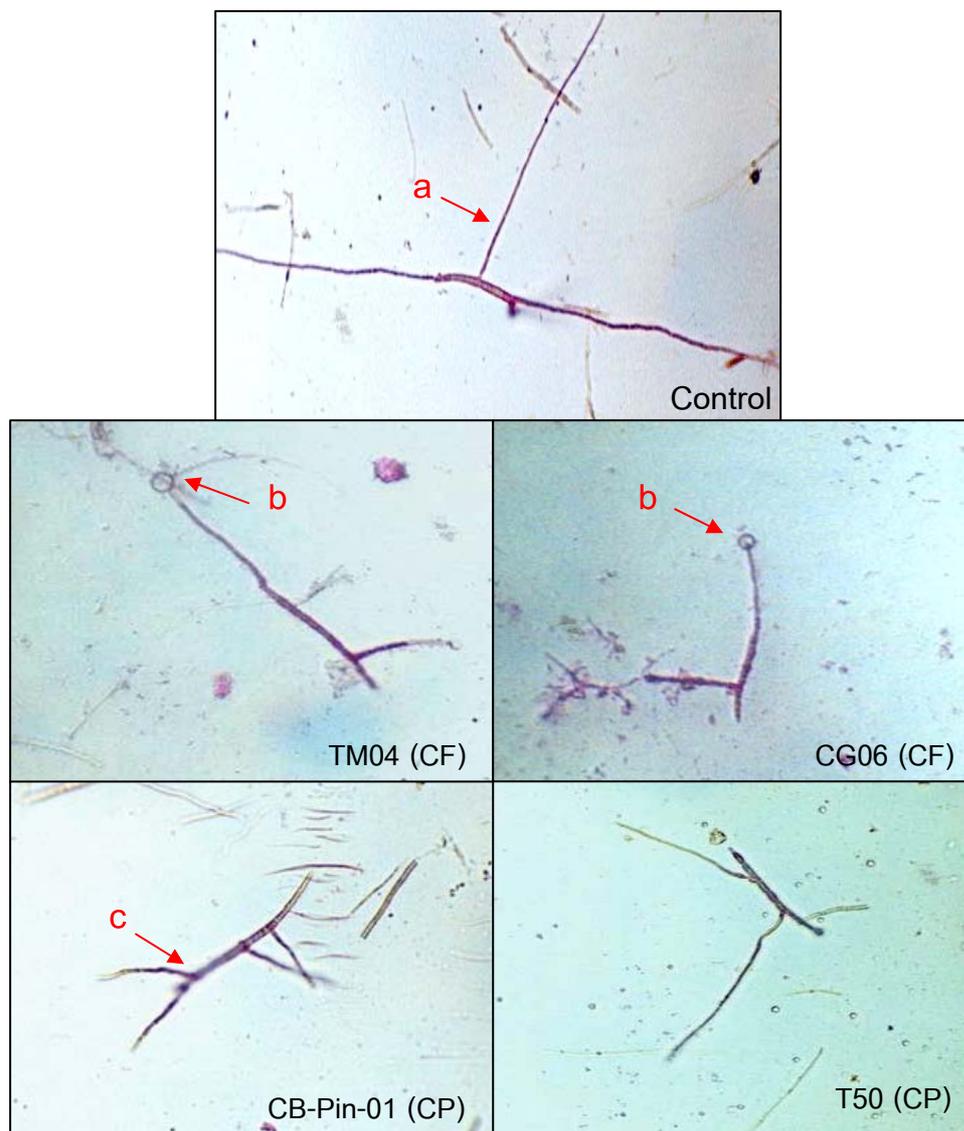
กรรมวิธี	ความยาวของเส้นใย (μm) ^{1/}	การยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใย (%)	ลักษณะการเจริญของเส้นใย
Control	656.45 a ^{4/}	0.00	เส้นใยเจริญและพัฒนาได้ดี
B03 (CS) ^{2/}	455.50 b	67.29	เส้นใยเจริญและพัฒนาได้ดี
B03 (CF) ^{3/}	295.13 c	8.84	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
CG06 (CS)	321.00 c	80.73	เส้นใยสั้น
CG06 (CF)	163.50 ef	18.91	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
CG30 (CS)	334.50 c	48.43	โป่งพองตรงปลายเส้นใย
CG30 (CF)	141.25 fg	2.17	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
WS16 (CS)	217.00 de	61.27	ข้อมไม่ติดสีตรงปลายเส้นใยในบางสปอร์
WS16 (CF)	235.63 d	6.41	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
TM04 (CS)	208.75 de	47.83	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
TM04 (CF)	194.13 d-f	16.76	เส้นใยสั้น โป่งพองตรงปลาย หรือกลางเส้นใย
mancozeb (1,200 ppm)	196.85 d-f	41.85	เส้นใยสั้น
benomyl (600 ppm)	87.38 g	86.39	-

หมายเหตุ^{1/} ความยาวของเส้นใยคำนวณได้จากความยาวของเส้นใยทั้งหมดที่เจริญและแตกแขนงออกมาจากสปอร์ของเชื้อรา

^{2/} เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (CS)

^{3/} สารกรองเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (CF)

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 3 อิทธิพลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปสารกรองเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 และสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*

a. เส้นใยปกติ, b. ปลายเส้นใยโป่งพอง, c. เส้นใยสั้นและแตกแขนง

3. การทดสอบความสามารถและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในเรือนปลูกครั้งที่ 1 (พ.ย. – ธ.ค. 49)

เมื่อพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ลงบนต้นกล้วยไม้ก่อนพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* 24 ชั่วโมง สามารถลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ได้เมื่อตรวจผลที่ 21 และ 35 วันหลังปลูกเชื้อโรค โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกสายพันธุ์ สามารถลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ เมื่อตรวจผลที่ 21 และ 35 วันหลังปลูกเชื้อโรค คือ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้ 95.09 และ 77.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 5) รองลงมาคือ *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ที่มีการเกิดโรคเท่าเทียมกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 โดยลดการเกิดโรคได้ 75.18 และ 63.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาคือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04

ในขณะที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่น เช่น เชื้อรา *T. virens* สายพันธุ์ TV-16, *T. longibrachiatum* สายพันธุ์ TL-01 และเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* สายพันธุ์ B03 มีความสามารถในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองรองลงมา จึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, T50 และเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 ไปทดสอบในครั้งต่อไป

ตารางที่ 5 ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้
หลังจากพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน
(การทดลองครั้งที่ 1 : พ.ย. – ธ.ค. 49)

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)		การลดการเกิดโรค (%)	
	21 วัน	35 วัน	21 วัน	35 วัน
Control (+Pd) ^{1/}	18.17 a ^{5/}	38.00 a	-	-
Control (-Pd) ^{1/}	0.39 c	12.27 d	97.16	67.71
CB-Pin-01	0.87 bc	10.72 d	95.21	71.78
T50	1.51 bc	10.92 d	91.67	71.26
TV16	6.18 bc	13.65 b-d	65.98	64.08
TL-01	6.55 bc	14.22 b-d	63.95	62.58
DU-07	3.74 bc	16.12 b-d	79.42	57.57
B03	6.02 bc	14.40 b-d	66.87	62.10
CG30	6.29 bc	19.10 bc	65.38	49.73
CG06	4.51 bc	13.95 b-d	75.18	63.29
WS16	6.28 bc	17.32 b-d	65.44	54.42
TM04	4.01 bc	14.15 b-d	77.98	62.76
CB + man ^{2/}	3.55 cb	14.97 b-d	80.46	60.61
CB-Pin-01 ½ ^{3/}	1.39 bc	11.12 cd	92.35	70.73
mancozeb ½ ^{4/}	3.85 bc	13.15 cd	78.81	65.39
mancozeb	0.55 c	10.47 d	96.97	74.45
benomyl	13.73 a	23.02 b	24.44	39.42

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

^{2/} สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ร่วมกับสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ในอัตราส่วน 1 : 1

^{3/} สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1/2 Dose)

^{4/} สารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1/2 Dose)

^{5/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) และ *B. cereus* (WS16) ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* หลังจากพ่นเชื้อโรค 35 วันเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control)

3.1 การตรวจปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนผิวใบกล้วยไม้

จากการตรวจนับปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่อยู่รอดบนใบทุกๆ สัปดาห์ พบว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปฏิบัติได้ใบมีมากกว่าด้านบน ตรวจพบเชื้อรา *Trichoderma* spp. อยู่ระหว่าง $0.2 - 9.8 \times 10^2$ CFU/ตารางเซนติเมตร โดยที่ปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01), *T. harzianum* (T50) และ *T. pseudokoningii* (DU-07) ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ สำหรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อยู่ระหว่าง $0.9 - 5.0 \times 10^3$ CFU/ตารางเซนติเมตร โดยที่ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) และ *B. amyloliquefaciens* (CG06) ไม่แตกต่างกันในทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 6)

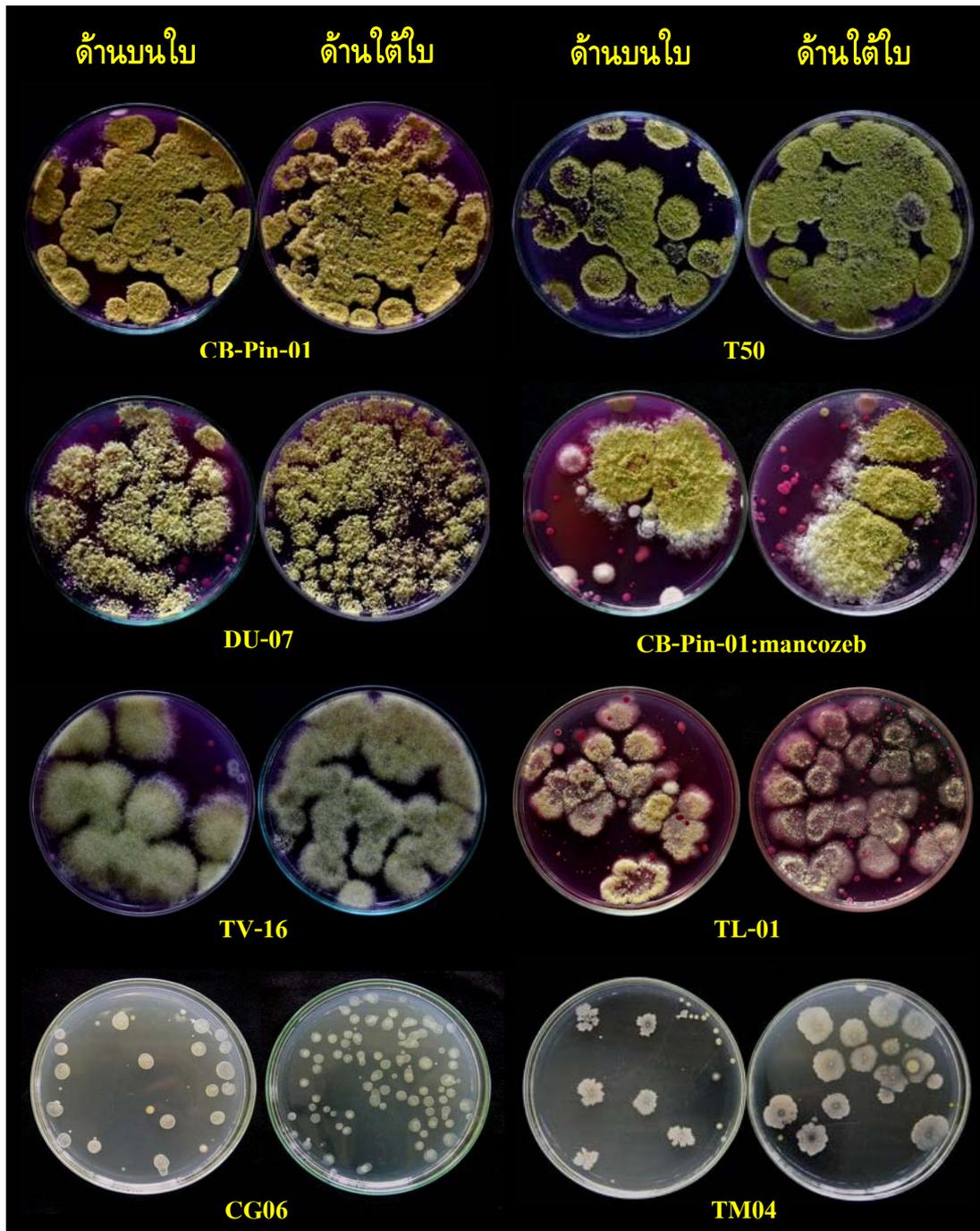
ตารางที่ 6 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผิวด้านบนใบ และด้านใต้ใบของกล้วยไม้เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปแล้ว 5 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 1 : พ.ย. – ธ.ค. 49)

กรรมวิธี	ผิวด้านบนใบ		ผิวด้านใต้ใบ	
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
	(x 10 ² CFU/cm ²)	(x 10 ³ CFU /cm ²)	(x 10 ² CFU/cm ²)	(x 10 ³ CFU /cm ²)
<i>T. harzianum</i> (CB-Pin-01)	4.9 a ^{3/}	-	9.0 ab	-
<i>T. harzianum</i> (T50)	4.7 a	-	7.0 ab	-
<i>T. virens</i> (TV16)	1.5 b	-	7.4 ab	-
<i>T. longibrachiatum</i> (TL-01)	1.1 b	-	5.1 ab	-
<i>T. pseudokoningii</i> (DU-07)	4.4 a	-	9.8 a	-
CB-Pin-01+ mancozeb (600 ppm) ^{1/}	0.2 b	-	0.3 b	-
CB-Pin-01 (½ dosage) ^{2/}	2.0 b	-	4.4 ab	-
<i>B. cereus</i> (B03)	-	1.9 a	-	2.4 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CG30)	-	0.9 a	-	1.5 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CG06)	-	1.2 a	-	3.0 ab
<i>B. cereus</i> (WS16)	-	1.1 a	-	2.0 b
<i>Bacillus</i> spp. (TM04)	-	1.4 a	-	5.0 a

หมายเหตุ ^{1/} สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ร่วมกับสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 15 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ในอัตราส่วน 1 : 1

^{2/} สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด อัตรา 100 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร (1/2 Dose)

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 5 โคลนินของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. (CB-Pin-01, T 50, DU-07, TV-16 และ TL-01) และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. (CG06 และ TM04) ที่ได้จาก ผีเสื้อค้ำบนและค้ำใต้ใบของกล้วยไม้ เมื่อใช้วิธี dilution spread plate บนอาหาร

4. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในเรือนปลูกครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50)

4.1 การประเมินระดับการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้

เริ่มประเมินอาการของโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้หลังจากพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ไปแล้ว 21 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรค โดยประเมินตั้งแต่ใบยอดลงมาจนถึงใบที่ 5 ในแต่ละต้น แบ่งอาการของโรคเป็น 6 ระดับ ตามเกณฑ์ข้างต้น แต่เนื่องจากได้ทำการทดลองนี้ในฤดูร้อนซึ่งมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมกับการเกิดโรค จึงพบว่าในระยะแรก ทุกกรรมวิธีปรากฏอาการของโรคไม่มากนัก กล่าวคือ ด้านบนใบเกิดเป็นแผลสีค่อนข้างเหลืองในปริมาณน้อย ด้านใต้ใบ มีผงสปอร์สีดำ ปกคลุมไม่มาก แต่อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีควบคุมซึ่งพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (+Pd) แสดงระดับอาการของโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีแมนโคเซบ กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีแมนโคเซบร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เท่าเทียมกัน (ตารางที่ 7)

จากการประเมินอาการของโรคอีกครั้งหลังจากพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* ไปแล้ว 35 วัน พบว่า กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อ *P. dendrobii* (+Pd) แสดงระดับอาการของโรคใบปื้นเหลืองสูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกรรมวิธีที่พ่นด้วยใช้สารเคมีแมนโคเซบ สามารถยับยั้งการเกิดโรค หรือแสดงอาการของโรคนี้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับกรรมวิธีที่ลดการเกิดโรคในระดับรองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

สำหรับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าไม่ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคที่สูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 หรือเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 แบบเดี่ยว แต่จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 แบบเดี่ยว อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 หรือ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B.*

amyloliquefaciens สายพันธุ์ CG06 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบบเดี่ยว คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 11.24 และ 12.62 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช หรือกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 ร่วมกับ สารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 12.21 และ 11.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้
หลังจากพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน
ในการทดลองครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50) ภายใต้สภาพเรือนปลูกกล้วยไม้

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)		การลดการเกิดโรค (%)	
	21 วัน	35 วัน	21 วัน	35 วัน
Control (+Pd) ^{1/}	19.87 a ^{9/}	32.43 a	-	-
Control (-Pd) ^{1/}	1.40 ef	11.22 b-e	92.95	65.40
CB-Pin-01 ^{2/}	1.27 f	8.19 de	93.61	74.75
CB-Pin-01+F ^{3/}	3.10 d-f	10.84 b-e	84.40	66.57
CB-Pin-01 ½ ^{4/}	2.27 d-f	10.15 b-e	88.58	68.70
T50 ^{2/}	1.32 ef	9.27 b-e	93.36	71.42
T50+F ^{3/}	2.30 d-f	10.37 b-e	88.42	68.02
T50 ½ ^{4/}	5.65 b-f	12.11 b-e	71.57	62.66
CG06 ^{2/}	3.92 c-f	8.66 c-e	80.27	73.30
CG06+F ^{3/}	7.47 b-f	10.48 b-e	62.41	67.68
CG06 ½ ^{4/}	8.32 b-e	12.55 b-e	58.13	61.30
TM04 ^{2/}	4.15 c-f	11.70 b-e	79.11	63.92
TM04+F ^{3/}	8.47 b-d	12.32 b-e	57.37	62.01
TM04 ½ ^{4/}	7.35 b-f	17.15 b-e	63.01	47.12
CB-Pin-01+CG06 ^{5/}	12.20 b	20.43 b	38.60	37.00
CB-Pin-01+TM04	7.02 b-f	11.24 b-e	64.67	65.34
T50+CG06	6.10 b-f	12.62 b-e	69.30	61.09
T50+TM04	9.02 b-d	18.91 b-d	54.60	41.69
CB-Pin-01+CG06+F ^{6/}	10.17 bc	19.45 bc	48.82	40.02
CB-Pin-01+TM04+F	7.32 b-f	12.21 b-e	63.16	62.35
T50+CG06+F	4.10 c-f	11.26 b-e	79.37	65.28
T50+TM04+F	7.87 b-f	15.28 b-e	60.39	52.88
mancozeb(1,200 ppm) ^{7/}	1.17 f	8.22 de	94.11	74.65
mancozeb+F ^{8/}	1.05 f	6.91 e	94.72	78.69

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

- 2/ ฟันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- 3/ ฟันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- 4/ ฟันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ ในอัตราส่วนที่เจือจางลง 1 เท่าจากปกติ (โดยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ใช้เชื้อสด 1 กก. ต่อน้ำ 200 ลิตร (5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TM04 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1) ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- 5/ ฟันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรบนใบกล้วยไม้ ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- 6/ ฟันจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- 7/ ฟันสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ โดยไม่ฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- 8/ ฟันสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช(F) บนใบกล้วยไม้ โดยไม่ฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- 9/ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

- C. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 แบบเดี่ยว
- D. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 แบบเดี่ยว
- E. กรรมวิธีที่พ่น *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับ *B. amyloliquefaciens* CG06 (อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร)
- F. กรรมวิธีที่พ่น *T. harzianum* T50 ร่วมกับ *Bacillus* sp. TM04 (อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร)
- G. กรรมวิธีที่พ่นสารเคมีแมนโคเซบ
- H. กรรมวิธีควบคุม (+Pd)



ภาพที่ 6 อาการของโรคใบเป็นเหลืองบนกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในสภาพเรือนปลูก ครั้งที่ 2 (มี.ค. – เม.ย. 50) หลังจากพ่นเชื้อโรค 35 วัน

A. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 แบบเดี่ยว

B. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 แบบเดี่ยว

4.2 การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (CG06) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* ได้ 44.4 และ 51.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (TM04) ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture

เชื้อรา <i>T. harzianum</i>	CB-Pin-01		T50	
	รัศมีโคโลนี	การยับยั้ง (%) ^{1/}	รัศมีโคโลนี	การยับยั้ง (%)
เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.				
control	4.5 a ^{2/}	-	4.5 a	-
<i>Bacillus</i> sp. TM04	4.5 a	0.00	4.5 a	0.00
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG06	2.5 b	44.4	2.2 b	51.1

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *T. harzianum* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อราในงานเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อราในงานควบคุม

$$\text{สูตร } \frac{C-T}{C} \times 100\%$$

C = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อราในงานควบคุม (cm)

T = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อราที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อแบคทีเรีย หลังหยุดการเจริญ (cm)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 7 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T 50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (CG06 และ TM04) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture

A. เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 (control)

B. เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 ยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

C. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 ไม่ยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

D. เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 ยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* T50

E. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 ไม่ยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* T50

4.3 การตรวจปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนผิวใบกล้วยไม้

จากการตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่อยู่รอดบนใบทุก ๆ สัปดาห์ พบว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิด พบที่ด้านใต้ใบมากกว่าด้านบนใบ เช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 โดยพบปริมาณของเชื้อรา *T. harzianum* อยู่ระหว่าง $2.6 - 13.3 \times 10^4$ CFU/ตารางเซนติเมตร โดยกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) แบบเดี่ยวมีปริมาณมากที่สุดทั้งด้านบนใบ และด้านใต้ใบ สำหรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อยู่ระหว่าง $4.2 - 14.0 \times 10^3$ CFU/ตารางเซนติเมตร โดยพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 และ *B. amyloliquefaciens* CG06 มีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ เป็นจำนวนมากทั้งด้านบนใบ และด้านใต้ใบเช่นกัน (ตารางที่ 9) นอกจากนี้กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ก็มีปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว (ตารางที่ 9)

4.4 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* บนผิวใบกล้วยไม้

จากการนำน้ำที่ได้จากการเช็ดผิวใบกล้วยไม้ด้วย cotton bud มาตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วย haemocytometer นับซ้ำละ 10 ครั้ง พบปริมาณของเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ด้านใต้ใบมากกว่าด้านบนใบ เช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในกรรมวิธีควบคุม (+Pd) มีจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ โรค 1 ตารางเซนติเมตร มากที่สุด คือมีปริมาณถึง 862 สปอร์/ตารางเซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีแมนโคเซบ พบเพียง 38 สปอร์ต่อพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรค 1 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10)

สำหรับกรรมวิธีที่พบจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* ต่อพื้นที่ใบทั้งด้านบนและด้านใต้ใบ ในจำนวนน้อยใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีแมนโคเซบ ได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผิวด้านบนใบ และด้านใต้ใบของกล้วยไม้เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปแล้ว 5 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 2 : มี.ค. – เม.ย. 50)

กรรมวิธี	ผิวด้านบนใบ		ผิวด้านใต้ใบ	
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
	(x 10 ⁴ CFU/cm ²)	(x 10 ⁶ CFU /cm ²)	(x 10 ⁴ CFU/cm ²)	(x 10 ⁶ CFU /cm ²)
CB-Pin-01 ^{1/}	8.50 a ^{6/}	-	13.30 a	-
CB-Pin-01+F ^{2/}	6.04 ab	-	8.42 ab	-
CB-Pin-01 ½ ^{3/}	3.63 b	-	6.14 ab	-
T50 ^{1/}	3.58 b	-	7.27 ab	-
T50+F ^{2/}	3.45 b	-	6.62 ab	-
T50 ½ ^{3/}	2.66 b	-	4.43 b	-
CG06 ^{1/}	-	7.75 a	-	11.72 a
CG06+F ^{2/}	-	6.17 a	-	9.87 a
CG06 ½ ^{3/}	-	4.25 a	-	7.98 a
TM04 ^{1/}	-	6.62 a	-	14.03 a
TM04+F ^{2/}	-	9.09 a	-	13.87 a
TM04 ½ ^{3/}	-	4.20 a	-	7.27 a
CB-Pin-01+CG06 ^{4/}	3.18 b	5.46 a	5.52 ab	12.32 a
CB-Pin-01+TM04	5.79 ab	3.42 a	8.32 ab	11.86 a
T50+CG06	2.98 b	6.03 a	3.19 b	11.88 a
T50+TM04	2.56 b	4.48 a	4.43 b	11.73 a
CB-Pin-01+CG06+F ^{5/}	2.91 b	5.63 a	4.14 b	13.22 a
CB-Pin-01+TM04+F	3.02 b	4.91 a	5.77 ab	10.31 a
T50+CG06+F	2.84 b	5.47 a	3.58 b	8.97 a
T50+TM04+F	3.32 b	3.21 a	4.60 b	8.70 a

หมายเหตุ ^{1/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา

P. dendrobii (Pd) ตาม

^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม

- ^{3/} ฟันจุลินทรีย์ปฏิบัติกับบนใบกล้วยไม้ ในอัตราส่วนที่เจือจางลง 1 เท่าจากปกติ (โดยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ใช้เชื้อสด 1 กก. ต่อน้ำ 200 ลิตร (5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TM04 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1) ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{4/} ฟันจุลินทรีย์ปฏิบัติที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรบนใบกล้วยไม้ และฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{5/} ฟันจุลินทรีย์ปฏิบัติที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ไว้ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงฟันเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{6/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

ตารางที่ 10 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ที่ผิวด้านบนและด้านใต้ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 5 ครั้ง ไปแล้ว 1 สัปดาห์ (การทดลองครั้งที่ 2 : มี.ค. – เม.ย. 50)

กรรมวิธี	จำนวนสปอร์เชื้อรา <i>P. dendrobii</i> (สปอร์/พื้นที่ใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค 1 ตร.ซม.)	
	ผิวด้านบนใบ	ผิวด้านใต้ใบ
Control (+Pd) ^{1/}	264 a	862 a
Control (-Pd) ^{1/}	68 d-h	208 c-f
CB-Pin-01 ^{2/}	43 gh	136 f
CB-Pin-01+F ^{3/}	69 d-h	163 ef
CB-Pin-01 ½ ^{4/}	81 d-h	185 c-f
T50 ^{2/}	59 gh	189 c-f
T50+F ^{3/}	80 d-h	180 c-f
T50 ½ ^{4/}	96 c-h	260 c-e
CG06 ^{2/}	78 d-h	233 c-f
CG06+F ^{3/}	85 d-h	195 c-f
CG06 ½ ^{4/}	89 d-h	181 c-f
TM04 ^{2/}	79 d-h	192 c-f
TM04+F ^{3/}	97 c-h	254 c-e
TM04 ½ ^{4/}	126 c-e	248 c-e
CB-Pin-01+CG06 ^{5/}	192 ab	433 b
CB-Pin-01+TM04	78 d-h	165 d-f
T50+CG06	138 b-d	275 cd
T50+TM04	57 e-h	260 c-e
CB-Pin-01+CG06+F ^{6/}	112 c-g	420 b
CB-Pin-01+TM04+F	56 e-h	181 c-f
T50+CG06+F	120 c-f	258 c-e
T50+TM04+F	161 bc	278 c
mancozeb (1,200 ppm) ^{7/}	38 h	212 c-f
mancozeb+F ^{8/}	48 f-h	222 c-f

- หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)
- ^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ ไร่ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ ไร่ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ ในอัตราส่วนที่เจือจางลง 1 เท่าจากปกติ (โดยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ใช้เชื้อสด 1 กก. ต่อน้ำ 200 ลิตร (5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TM04 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.1) ไร่ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{5/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรบนใบกล้วยไม้ ไร่ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{6/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผสมโดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ ไร่ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd) ตาม
- ^{7/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{8/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) ร่วมกับสารละลายปุ๋ย และสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{9/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

5. การประยุกต์ใช้เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในเรือนปลูกครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค. 50)

5.1 การประเมินระดับการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้

พ่นจุลินทรีย์ปฏิชีวนะลงบนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก 24 ชั่วโมงก่อนพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* แล้วดูแลตามปกติต่ออีก 21 วัน จึงเริ่มแสดงอาการของโรคบนใบกล้วยไม้ การประเมินโรคครั้งแรก พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบ และไม่พ่นเชื้อโรค แสดงอาการโรคน้อยที่สุดโดยลดอาการของโรคได้ถึง 82.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อ (+Pd) และไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 T50 และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และไม่พ่นเชื้อโรค รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิชีวนะแต่ละชนิดร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และพ่นเชื้อโรค ซึ่งเกิดโรคในระดับเทียบเท่ากับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นเชื้อโรค (-Pd) และกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบและพ่นเชื้อโรค โดยเกิดโรคในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ส่วนในการประเมินโรคครั้งที่ 2 หลังจากพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* ไปแล้ว 35 วัน ทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิชีวนะต่าง ๆ นั้นลดการเกิดโรคได้ โดยสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มแรก เป็นกลุ่มที่ลดการเกิดโรคได้ดีในกรณีที่ไม่มีการพ่นเชื้อโรค ได้แก่ กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบ และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* T50 ที่สามารถลดการเกิดโรคได้ 80.24 79.42 และ 74.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่ลดการเกิดโรคได้ในระดับที่เท่ากับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อโรค (-Pd) แม้ว่าจะมีการปลูกเชื้อโรคให้ด้วยก็ตาม เช่น กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และพ่นเชื้อโรค กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบ ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรค และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรค โดยลดการเกิดโรคได้ถึง 74.91 73.44 และ 65.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเกิดโรคใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อ (+Pd) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ลดการเกิดโรคได้ 70.46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้
หลังจากพ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (Pd) ไปแล้ว 21 และ 35 วัน ใน
การทดลองครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)		การลดการเกิดโรค (%)	
	21 วัน	35 วัน	21 วัน	35 วัน
Control (+Pd) ^{1/}	28.76 a ^{8/}	47.63 a	-	-
Control (-Pd) ^{1/}	8.46 b-d	14.07 c-e	70.58	70.46
CB-Pin-01 ^{2/}	5.00 d	9.41 e	82.61	80.24
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	7.02 cd	16.64 b-e	75.59	65.06
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	10.26 b-d	19.32 b-d	64.33	59.44
T50 ^{2/}	5.42 d	9.98 e	81.15	79.05
T50 + F + Pd ^{3/}	8.87 b-d	19.85 cb	69.16	58.32
T50 + Pd ^{4/}	13.37 bc	21.18 cb	53.51	55.53
CG06 ^{2/}	5.71 d	11.95 de	80.15	74.91
CG06 + F + Pd ^{3/}	9.32 b-d	18.96 b-d	67.59	60.19
CG06 + Pd ^{4/}	15.12 b	24.38 b	47.43	48.81
mancozeb ^{5/}	4.92 d	9.80 e	82.89	79.42
mancozeb + F + Pd ^{6/}	7.37 cd	12.65 de	74.37	73.44
mancozeb + Pd ^{7/}	9.37 b-d	19.12 b-d	67.42	59.86

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{5/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{6/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

- ^{7/} ฟอสฟอรัสเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร(1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และ
วัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{8/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

- C. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 แต่ไม่พ่นเชื้อโรค
- D. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 และพ่นเชื้อโรค
- E. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 แต่ไม่พ่นเชื้อโรค
- F. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 และพ่นเชื้อโรค
- G. กรรมวิธีที่พ่นสารเคมีแมนโคเซบ
- H. กรรมวิธีควบคุม (+Pd)



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ ในเรือนปลูก ครั้งที่ 3 (ก.ค. – ต.ค. 50)
 A. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 แต่ไม่พ่นเชื้อโรค
 B. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และพ่นเชื้อโรค

5.2 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* บนผิวใบกล้วยไม้

จากการนำน้ำที่ได้จากการเช็ดผิวใบกล้วยไม้ มาตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วย haemocytometer ซ้ำละ 10 ครั้ง พบปริมาณของเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ด้านใต้ใบมากกว่าด้านบนใบ เช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โยที่กรรมวิธีควบคุม (+Pd) มีจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค 1 ตารางเซนติเมตร มากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีปริมาณถึง 1,244 สปอร์ ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบ และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และไม่พ่นเชื้อโรค พบสปอร์ต่อพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรค 1 ตารางเซนติเมตร ที่ด้านใต้ใบน้อยที่สุดเพียง 264 และ 314 สปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

พบจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* ต่อพื้นที่ใบในจำนวนที่ใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุม (-Pd) ในทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด สารเคมีแมนโคเซบ ทั้งแบบเดี่ยว หรือร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช ทั้งที่มีการพ่นและไม่พ่นเชื้อโรค ดังแสดงในตารางที่ 12

5.3 การตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

5.3.1 การตรวจปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus amyloliquefaciens บนผิวใบกล้วยไม้

ตรวจพบปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิด ที่ด้านใต้ของใบมากกว่าด้านบนใบ โดยพบปริมาณของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 อยู่ระหว่าง $1.8 - 6.4 \times 10^2$ CFU/ตารางเซนติเมตร ซึ่งถือว่ามีความไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ทั้งที่อยู่ด้านบนใบและด้านใต้ของใบก็มีปริมาณระหว่าง $2.3 - 7.4 \times 10^5$ CFU/ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ที่ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสัปดาห์ จำนวน 10 ครั้ง (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	จำนวนสปอร์เชื้อรา <i>P. dendrobii</i> (สปอร์ / พื้นที่ใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค 1 ตร.ซม.)	
	ผิวด้านบนใบ	ผิวด้านใต้ใบ
Control (+Pd) ^{1/}	444 a ^{8/}	1,244 a
Control (-Pd) ^{1/}	188 bc	377 b-d
CB-Pin-01 ^{2/}	166 bc	314 cd
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	191 bc	373 b-d
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	221 bc	425 b-d
T50 ^{2/}	204 bc	343 bc
T50 + F + Pd ^{3/}	226 bc	443 bc
T50 + Pd ^{4/}	231 b	498 b
CG06 ^{2/}	154 bc	426 b-d
CG06 + F + Pd ^{3/}	220 bc	441 b-d
CG06 + Pd ^{4/}	242 b	491 bc
mancozeb ^{5/}	116 c	264 d
mancozeb + F + Pd ^{6/}	180 bc	370 b-d
mancozeb + Pd ^{7/}	220 bc	420 b-d

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{5/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{6/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

- ^{7/} ฟันสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร(1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{8/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

ตารางที่ 13 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 ,T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (CG06) ที่ผิวด้านบนใบ และด้านใต้ใบของกล้วยไม้ หลังพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 10 ไปแล้ว 1 สัปดาห์ (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	ผิวด้านบนใบ		ผิวด้านใต้ใบ	
	<i>T. harzianum</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	(x 10 ³ CFU/cm ²)	(x 10 ⁵ CFU /cm ²)	(x 10 ³ CFU/cm ²)	(x 10 ⁵ CFU /cm ²)
CB-Pin-01 ^{1/}	3.04 a ^{4/}	-	4.16 a	-
CB-Pin-01 + F + Pd ^{2/}	2.22 a	-	3.27 a	-
CB-Pin-01 + Pd ^{3/}	2.60 a	-	3.55 a	-
T50 ^{1/}	4.25 a	-	6.36 a	-
T50 + F + Pd ^{2/}	2.78 a	-	5.27 a	-
T50 + Pd ^{3/}	3.39 a	-	5.79 a	-
CG06 ^{1/}	-	2.80 a	-	6.19 a
CG06 + F + Pd ^{2/}	-	5.04 a	-	7.37 a
CG06 + Pd ^{3/}	-	2.30 a	-	6.93 a

- หมายเหตุ** ^{1/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

5.3.2 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในวัสดุปลูก

เมื่อนำน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่บีบได้จากกาบมะพร้าว 10 กรัมที่เป็นวัสดุปลูก ในแต่กรรมวิธีหลังสิ้นสุดการทดลอง มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลองยังสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในกาบมะพร้าว โดยพบว่าปริมาณของเชื้อรา *T. harzianum* อยู่ระหว่าง $1.6 - 2.8 \times 10^4$ CFU/ml ในกรรมวิธีที่พ่นด้วย T50 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรค มีปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* จำนวนมากที่สุด สำหรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 อยู่ระหว่าง $7.3 - 8.6 \times 10^6$ CFU/ml โดยพบว่าในกรรมวิธีที่พ่นด้วยสายพันธุ์ CG06 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรค มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CG06 มากที่สุด (ตารางที่ 14)

5.3.3 การตรวจเปอร์เซ็นต์การครอบครองราก

หลังจากวางรากกล้วยไม้ที่ฆ่าเชื้อที่ผิวรากแล้วด้วย 0.525 % และ 1.575 % sodium hypochlorite บนอาหารต่าง ๆ โดยแบ่งเป็นส่วนโคนราก กลางราก และปลายราก พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 นั้น แบคทีเรียเจริญออกมาจากชิ้นรากได้ดี ดังแสดงในภาพที่ 9 และสามารถเจริญครอบครองรากกล้วยไม้ได้ดีทุกส่วนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 15) เช่นเดียวกับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ที่พบว่ามีการเจริญของเชื้อราออกมาจากชิ้นรากได้ดี แม้ว่าจะล้างรากด้วย 0.525 % sodium hypochlorite (0.525 % NaOCl) ในขณะที่ทดสอบวางชิ้นรากโดยฆ่าเชื้อที่ผิวรากด้วย 1.575 % sodium hypochlorite (1.575 % NaOCl) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* เจริญออกมาจากชิ้นรากกล้วยไม้ได้น้อยลง อย่างไรก็ตามยังพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถเข้าครอบครองที่บริเวณโคนรากได้มากกว่า กลางราก และปลายราก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ปริมาณประชากรของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (CG06) ในน้ำที่บีบออกมาจากกาบมะพร้าวที่ใช้เป็นวัสดุปลูก 10 กรัม เมื่อครบ 1 สัปดาห์ หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในน้ำที่บีบออกมาจากกาบมะพร้าว (CFU/ml)
Control (-Pd) ^{1/}	ND ^{5/}
Control (+Pd) ^{1/}	ND
CB-Pin-01 ^{2/}	2.0×10^4
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	2.3×10^4
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	1.6×10^4
T50 ^{2/}	2.3×10^4
T50 + F + Pd ^{3/}	2.8×10^4
T50 + Pd ^{4/}	1.9×10^4
CG06 ^{2/}	7.6×10^6
CG06 + F + Pd ^{3/}	8.6×10^6
CG06 + Pd ^{4/}	7.3×10^6

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{5/} ND = ไม่ได้ตรวจสอบ (not determined)

ตารางที่ 15 เปรูเซ็นต์การครอบครองรากส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยจุลินทรีย์
 ปฏิปักษ์เชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01, T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus
 amyloliquefaciens* (CG06) หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 10) เป็นเวลา
 1 สัปดาห์

กรรมวิธี	การเจริญครอบครองราก					
	ล้างด้วย 0.525 % NaOCl			ล้างด้วย 1.575 % NaOCl		
	โคนราก	กลางราก	ปลายราก	โคนราก	กลางราก	ปลายราก
Control (-Pd) ^{1/}	ND ^{6/}	ND	ND	ND	ND	ND
Control (+Pd) ^{1/}	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CB-Pin-01 ^{2/}	93.33 ab ^{7/}	86.67 ab	6.67 d	40.00 c	33.33 c	13.33 bc
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	93.33 ab	80.00 ab	13.33 cd	46.67 c	40.00 bc	6.67 c
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	86.67 ab	73.33 bc	6.67 d	40.00 c	33.33 c	6.67 c
T50 ^{2/}	86.67 ab	53.33 c	20.00 b-d	60.00 b	60.00 b	33.33 b
T50 + F + Pd ^{3/}	73.33 b	66.67 bc	33.33 bc	60.00 b	60.00 b	20.00 bc
T50 + Pd ^{4/}	73.33 b	53.33 c	40.00 b	66.67 b	60.00 b	33.33 b
CG06 ^{2/}	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CG06 + F + Pd ^{3/}	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
CG06 + Pd ^{4/}	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
mancozeb (1,200 ppm) ^{5/}	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)

^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

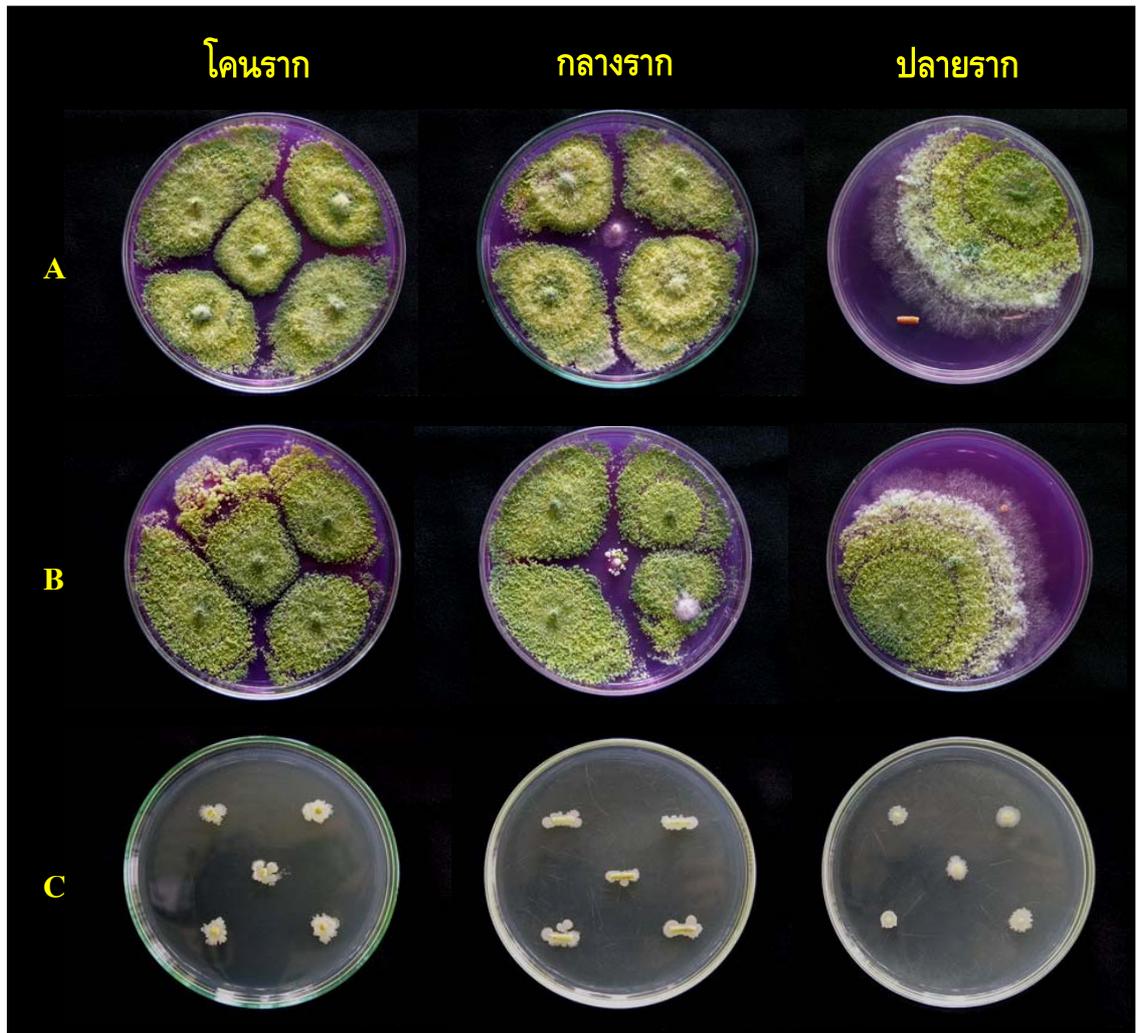
^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{5/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{6/} ND = ไม่ได้ตรวจสอบ (not determined)

^{7/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 9 การเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่เจริญครอบครองรากส่วนต่างๆของกล้วยไม้หลังจากล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hypochlorite แล้ววางบนอาหารจำเพาะ

A. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

B. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T50

C. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06

5.3.4 ผลผลิตดอกกล้วยไม้ ความยาวราก และจำนวนรากของกล้วยไม้

จากการบันทึกผลข้อมูลของกล้วยไม้ เช่น จำนวนช่อดอก ความยาวช่อดอก และจำนวนดอกต่อช่อ หลังจากการพ่นจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และพ่นเชื้อโรคร มีจำนวนช่อดอกต่อกระถางมากที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และพ่นเชื้อโรคร คือมีจำนวนช่อ 11 และ 9 ช่อ/กระถาง ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรคร มีความยาวช่อดอก และจำนวนดอกต่อช่อมากที่สุด โดยมีความยาวช่อดอกถึง 40.90 เซนติเมตรและมีดอก 13 ดอกต่อช่อ รองลงมาคือกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แบบเดี่ยว ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชและพ่นเชื้อโรคร มีความยาวรากมากที่สุดถึง 58.7 เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งยาวมากกว่ากรรมวิธีควบคุมทั้งสอง (-Pd, +Pd) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แตกต่างกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิบัติอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า มีจำนวนรากต่อต้นมากที่สุด คือ 24 ราก และมีจำนวนรากเกิดใหม่มากที่สุดด้วย รองลงมาคือกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แบบเดี่ยว และกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และพ่นเชื้อโรคร ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลผลิตของดอกกล้วยไม้ หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 ,T50) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (CG06) และร่วมหรือไม่ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	ผลผลิตดอกกล้วยไม้			
	จำนวนช่อดอกต่อกระถาง	จำนวนช่อดอกต่อ 3 ลำหน้า	ความยาวช่อดอก (ซม.)	จำนวนดอกต่อช่อ
Control (+Pd) ^{1/}	5	3	22.37	5
Control (-Pd) ^{1/}	5	4	31.25	8
CB-Pin-01 ^{2/}	7	5	39.60	13
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	11	7	41.80	15
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	6	5	33.90	10
T50 ^{2/}	7	5	36.40	9
T50 + F + Pd ^{3/}	5	4	38.50	12
T50 + Pd ^{4/}	4	4	31.50	9
CG06 ^{2/}	8	5	33.70	9
CG06 + F + Pd ^{3/}	9	6	36.55	11
CG06 + Pd ^{4/}	7	5	30.50	8
mancozeb (1,200 ppm) ^{5/}	3	3	31.17	7
mancozeb + F + Pd ^{6/}	5	4	31.70	9
mancozeb + Pd ^{7/}	4	3	23.95	6

- หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ่นเชื้อ (-Pd)
- ^{2/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{3/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F)บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{4/} พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{5/} พ่นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร(1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

- ^{6/} ฟันสารเคมีแมนโคเซบ ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{7/} ฟันสารเคมีแมนโคเซบ บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

ตารางที่ 17 ความยาวราก จำนวนรากต่อต้น และจำนวนรากใหม่ต่อต้นของกล้วยไม้ หลังพ้น
 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 ,T50) และเชื้อแบคทีเรีย
Bacillus amyloliquefaciens (CG06) และร่วมหรือไม่ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมี
 กำจัดแมลงศัตรูพืช (F) (การทดลองครั้งที่ 3 : ก.ค. – ต.ค. 50)

กรรมวิธี	ความยาวราก(ซม.) ^{8/}	จำนวนรากต่อต้น	จำนวนรากใหม่ต่อต้น ^{9/}
Control (+Pd) ^{1/}	34.28 d ^{10/}	10	2
Control (-Pd) ^{1/}	39.92 cd	14	4
CB-Pin-01 ^{2/}	50.90 ab	22	10
CB-Pin-01 + F + Pd ^{3/}	58.72 a	24	12
CB-Pin-01 + Pd ^{4/}	41.77 b-d	20	9
T50 ^{2/}	42.81 b-d	16	6
T50 + F + Pd ^{3/}	46.07 bc	22	9
T50 + Pd ^{4/}	40.95 cd	16	5
CG06 ^{2/}	37.99 cd	15	5
CG06 + F + Pd ^{3/}	43.24 b-d	17	7
CG06 + Pd ^{4/}	37.01 cd	16	4
mancozeb (1,200 ppm) ^{5/}	37.28 cd	12	3
mancozeb + F + Pd ^{6/}	40.03 cd	15	5
mancozeb + Pd ^{7/}	36.28 cd	11	3

หมายเหตุ ^{1/} กรรมวิธีควบคุมที่พ้นเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (+Pd) และไม่พ้นเชื้อ (-Pd)

^{2/} พ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ้นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{3/} พ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F)บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ้นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{4/} พ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ้นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{5/} พ้นสารเคมีแมนโคเซบ อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร(1,200 ppm) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก โดยไม่พ้นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

^{6/} พ้นสารเคมีแมนโคเซบ ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (F) บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ้นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)

- ^{7/} ฟันสารเคมีแมนโคเซบ บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* (Pd)
- ^{8/} ความยาวราก วัดจากโคนรากถึงปลายรากของทุกรากของต้นกล้วยไม้
- ^{9/} จำนวนรากที่เกิดใหม่ หลังการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบกล้วยไม้ และวัสดุปลูก วัดจากโคนรากถึงปลายราก ซึ่งมีความยาวไม่เกิน 10 เซนติเมตร
- ^{10/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 10 ความยาวช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิบัติการร่วมกับสารละลาย ปุ๋ย และสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

A. Control (-Pd)

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

C. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T50

D. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06

E. สารเคมีแมนโคเซบ

F. Control (+Pd)



ภาพที่ 11 ความยาวราก จำนวนราก หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิบัติกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช

A. Control (-Pd)

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

C. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T50

D. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06

E. สารเคมีแมนโคเซบ

F. Control (+Pd)

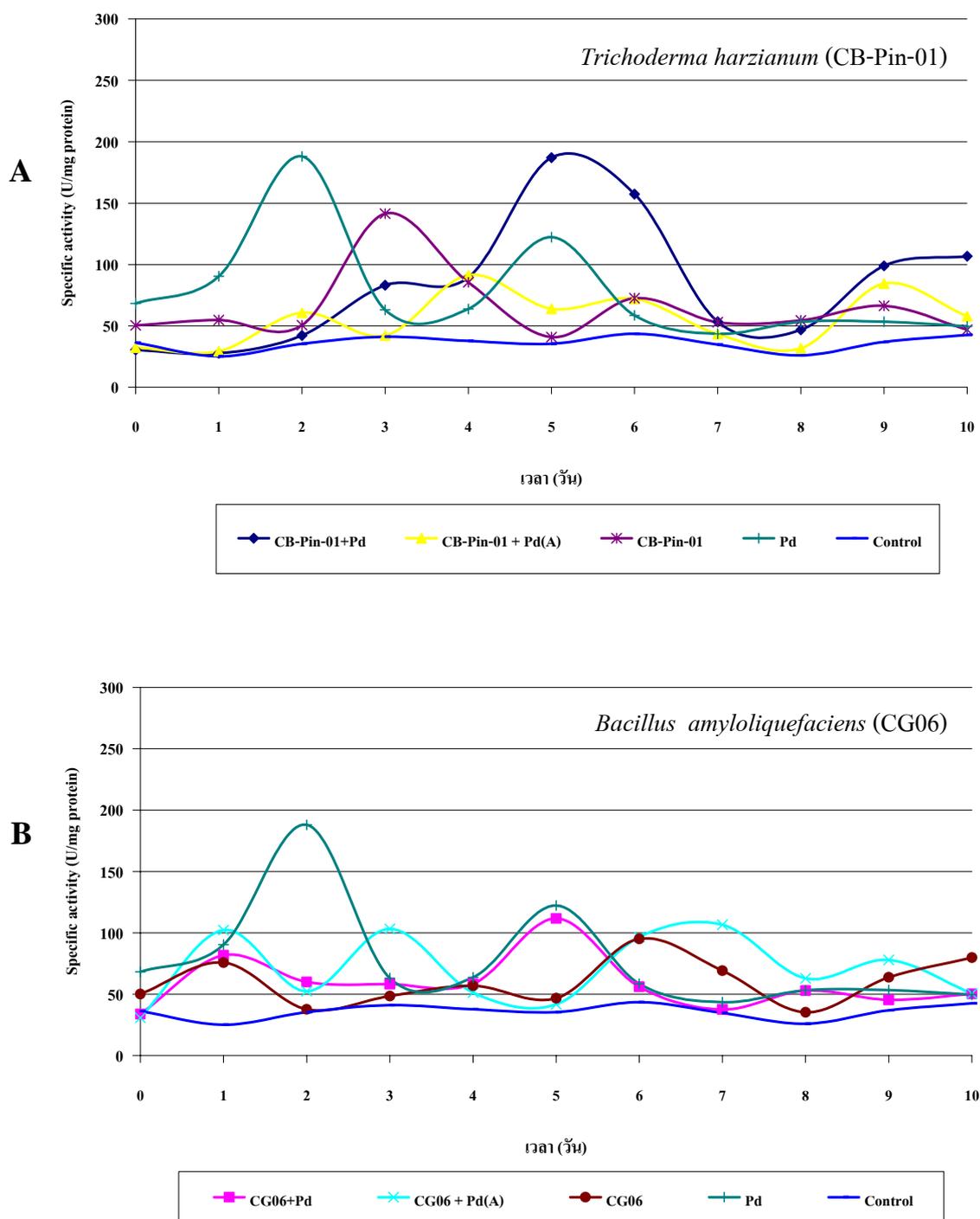
6. การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase เอนไซม์ ในใบกล้วยไม้สกุลหวาย

6.1 เอนไซม์ β -1,3-glucanase

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่ใบยอดของกล้วยไม้ ที่ช่วงเวลา 0-10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในวันที่ 0 และพ่นเชื้อโรค (เชื้อรา *P. dendrobii* ; Pd) ในวันที่ 1 พบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อโรค (-Pd) มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับสม่ำเสมอทุกวัน ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อโรค (+Pd) มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จากนั้นลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 5 (ภาพที่ 12)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 พบว่า กรรมวิธีที่พ่น *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ก่อนพ่นเชื้อโรค (CB-Pin-01+Pd(A)) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นจะลดลง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 6 และ 9 มีค่าเท่ากับ 72.01 และ 84.45 U/mg protein สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) ที่สร้างขึ้นในวันเดียวกัน ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่น *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 อย่างเดียว มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 และยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 6 และ 9 มีค่าเท่ากับ 72.55 และ 66.25 U/mg protein ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่พ่น *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ก่อนพ่นเชื้อโรค (CB-Pin-01+Pd(A)) (ภาพที่ 12A)

สำหรับกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 พบว่ากรรมวิธีที่พ่นสายพันธุ์ CG06 ก่อนพ่นเชื้อโรค มีแนวโน้มสูงขึ้นในวันที่ 1 3 และ 6 โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เท่ากับ 102.29 103.14 และ 96.56 U/mg protein และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสายพันธุ์ CG06 อย่างเดียว มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ในช่วงแรกที่ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ฉีดพ่นเชื้อโรค (+Pd) โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase เท่ากับ 95.13 U/mg protein จากนั้นลดลงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีก โดยในวันที่ 9 เพิ่มขึ้นสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 12B)



ภาพที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ β -1,3-glucanase (U/mg protein) ที่เบยอคกล้วยไม้สร้างขึ้น ในช่วง 0-10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

A. กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

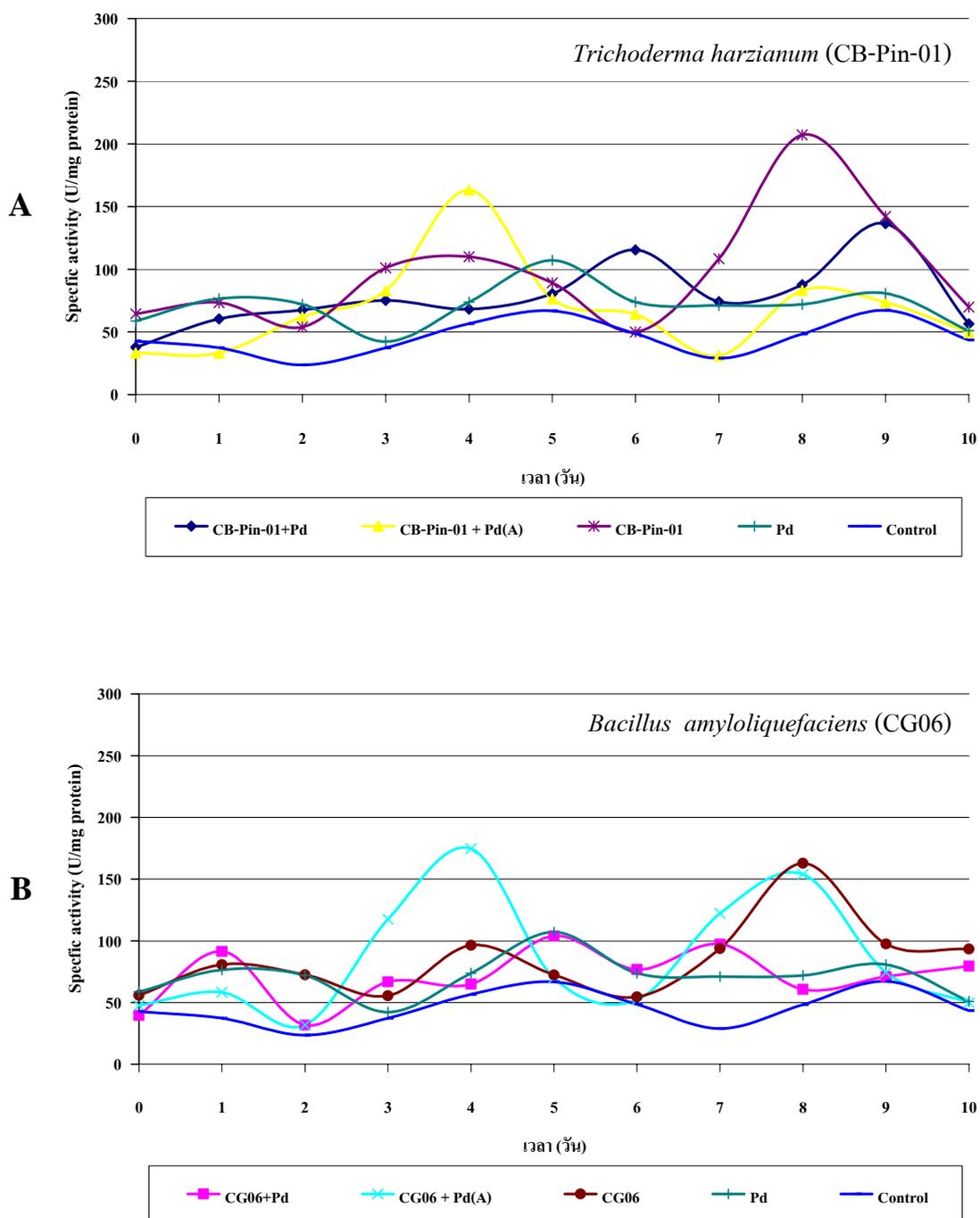
B. กรรมวิธีที่พ่นแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

6.2 เอนไซม์ chitinase

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในใบแก่ของกล้วยไม้ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ช่วงเวลา 0-10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในวันที่ 0 และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* ในวันที่ 1 พบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อโรค (-Pd) มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในระดับที่เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อโรค (+Pd) มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 แล้วลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 9 (ภาพที่ 13)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 พบว่า กรรมวิธีที่พ่นสายพันธุ์ CB-Pin-01 ก่อนพ่นเชื้อโรค (CB-Pin-01+Pd(A)) มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 163.33 U/mg protein จากนั้นจะลดลง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 8 สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) ที่สร้างขึ้นในวันเดียวกัน ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นสายพันธุ์ CB-Pin-01 อย่างเดียว โดยกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 4 และ 7 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 8 โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เท่ากับ 207.15 U/mg protein ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ +Pd) (ภาพที่ 13A)

สำหรับกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 พบว่ากรรมวิธีที่พ่นแบคทีเรียสายพันธุ์ CG06 ก่อนพ่นเชื้อโรค มีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 174.66 U/mg protein จากนั้นจึงลดลงและมีแนวโน้มสูงขึ้นอีก โดยในวันที่ 7 และ 8 มีค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสายพันธุ์ CG06 อย่างเดียว มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 1 4 และ 7 และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 8 โดยมีค่า specific activity ของเอนไซม์ chitinase เท่ากับ 162.84 U/mg protein ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นและพ่นเชื้อโรค (-Pd และ+Pd) ที่สร้างขึ้นในวันเดียวกัน (ภาพที่ 13B)



ภาพที่ 13 ปริมาณเอนไซม์ chitinase (U/mg protein) ที่ใบยอดกล้วยไม้สร้างขึ้นในช่วง 0-10 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

A. กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

B. กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

วิจารณ์

การทดลองในช่วงแรกที่แยกเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* จากผิวใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคใบปื้นเหลืองให้บริสุทธิ์แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร Synthetic mucor agar (SMA) พบว่าเชื้อราเจริญได้ช้าและไม่สร้างสปอร์ ต่างกับที่ Tzen *et al.* (1992) ได้รายงานว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีบนอาหารชนิดนี้ ทำให้เส้นใยของเชื้อราเจริญดีที่สุด และสร้างสปอร์ได้น้อย แม้ว่าจะนำเชื้อรามาล้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8[®] juice agar ซึ่งมีรายงานว่า สามารถที่จะชักนำให้มีการสร้างเส้นใยและสร้างสปอร์ได้ดี (El-Gholl, 1982) แต่ก็พบว่าเชื้อราเจริญได้ช้า และมีการสร้างสปอร์น้อยมาก จึงต้องเปลี่ยนวิธีการเตรียมสปอร์แขวนลอยด้วยการใช้ฟุ้งกันปิดสปอร์จากใบกล้วยไม้โดยตรงแทน ซึ่งพบว่าสะดวก และได้ผลดี เช่นเดียวกันกับการศึกษาในมะเขือเทศ ที่เป็นโรคราใบดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *P. fuligena* ตามวิธีการของพราวมาส (2550) โดยพบว่ากล้วยไม้แสดงอาการของโรคได้ดีหลังปลูกเชื้อโรคไปแล้วเช่นกัน ดังนั้น การปิดสปอร์จากผิวใบพืชที่แสดงอาการโดยตรง จึงจัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้เตรียม inoculum ได้ดี แต่มีข้อควรระวังคือ ต้องเลือกใบที่แสดงอาการโรคเพียงโรคเดียวเท่านั้น วิธีนี้อาจมีข้อจำกัดคือ เชื้อราต้องสร้างสปอร์ปริมาณมากบนบริเวณที่แสดงอาการโรคบนใบพืช อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อรา *P. dendrobii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลากหลายชนิด ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่จะช่วยให้เชื้อราสามารถเจริญได้ดีและมีการสร้างสปอร์ในปริมาณมากได้ต่อไปในอนาคต

เนื่องจากเชื้อรา *P. dendrobii* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ช้ามาก จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองในห้องปฏิบัติการ ด้วยการทดสอบการยับยั้งการงอก และการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค แทนวิธี dual culture ที่เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยทั่วไป ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ความเป็นไปได้ว่า การสร้างปฏิชีวนสาร เป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Fravel, 1988) งานวิจัยก่อนหน้าของ Intana (2003) พบว่าการนำสารกรอง (culture filtrate) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอาหาร 1/5 PDB มาสกัดด้วย ethyl acetate จะได้สาร pentyl pyrone oxazole และ harzianic acid ที่มีผลต่อต้านการเจริญของเชื้อรา *Pythium* spp. ได้ดี ดังนั้น จึงได้นำเชื้อรา *T. harzianum* มาเลี้ยงในอาหาร 1/5 PDB แล้วนำมากรองเพื่อให้ได้สารกรองที่มีสารทุติยภูมิอยู่ นำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อโรค ซึ่งผลการทดสอบก็พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และการพัฒนาของ germ tube ได้ดี ได้มีการทดสอบเปรียบเทียบกับสารกรองเชื้อรา *T. harzianum* ที่ได้จากการเลี้ยงในข้าวสุก ซึ่งพบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. dendrobii* ได้ค่อนข้างต่ำ

เนื่องมาจากในสารกรองมีส่วนของอาหารที่ยังเหลืออยู่ ซึ่งอาจไปมีผลกระตุ้นหรือส่งเสริมให้เชื้อโรคสามารถเจริญได้ ถึงแม้ว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งอยู่ก็ตาม จึงทำให้สารกรองควบคุมโรคได้ค่อนข้างน้อย สอดคล้องกับงานทดลองของชมพูนุท (2550) และ วราภรณ์ (2550)

ในกรณีของสารกรองของแบคทีเรีย พบว่าส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของ germ tube และทำให้บริเวณหัวและท้ายสปอร์โป่งพองผิดปกติ จึงเชื่อว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ ตามที่ Besson *et al.*, (1984) ได้รายงานไว้ว่าแบคทีเรียใน genus *Bacillus* มีการผลิตสาร acetic acid, isobutyric acid และ α -methyl butyric acid ออกมา และสอดคล้องกับการทดลองของ Jee *et al.*, (1988) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินปลูกพริก 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum* เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cepacia* และ *Bacillus polymyxa* มีผลต่อเชื้อรา *Phytophthora capsici* โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลไปยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของ zoospore และ sporangium ของเชื้อโรคได้ดี การใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ก็สามารถก่อให้เกิดการผิดปกติของสปอร์ดังกล่าวได้เช่นเดียวกับสารกรอง เพียงแต่ประสิทธิภาพยังไม่เทียบเท่ากับการใช้สารกรอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ พราวมาส (2550) ที่ทำการทดสอบกับสปอร์เชื้อรา *P. fuligena* สาเหตุโรคราใบดำของมะเขือเทศ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองในเรือนปลูกกล้วยไม้ช่วงต้นฤดูหนาว ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการเกิดโรค พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคและลดการเกิดโรคได้ไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมี mancozeb (80 WP) ในทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cerato *et al.*, (2003) ที่พบว่า เชื้อรา *T. hamatum*, *T. longibrachiatum* และ *T. koningii* มีความสามารถในการสร้างปฏิชีวนะได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำไปทดสอบในสภาพแปลงปลูก โดยการพ่น ต้น sugar beet ก็สามารถควบคุมโรคใบจุดเซอร์โคสปอราได้ โดยพบว่า สามารถลดขนาดของแผล และลดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Cercospora beticola* ได้

แบคทีเรียปฏิปักษ์บางชนิดมีประสิทธิภาพดีเยี่ยมในห้องปฏิบัติการ แต่กลับไม่สามารถควบคุมโรคได้ในสภาพแปลง อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมจริงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อการสร้างสารปฏิชีวนะ หรือกิจกรรมอื่น ๆ ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคด้อยลง ดังเช่นในการทดลองนี้ พบว่าสารกรอง และเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ WS16 ที่สามารถทำให้ germ tube และเส้นใยของเชื้อรา *P. dendrobii* สั้น โป่งพองผิดปกติและไม่สามารถเจริญได้

แต่เมื่อทดสอบโดยพ่นลงบนใบกล้วยไม้ที่ปลูกในสภาพเรือนปลูก พบว่าอาการของโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้กลับปรากฏชัดเจน และใกล้เคียงกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามยังพบว่าการพ่นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 ที่มีประสิทธิภาพดีจากห้องปฏิบัติการ ก่อนปลูกเชื้อโรค 24 ชั่วโมงสามารถควบคุมโรคได้ดีในสภาพเรือนปลูก เช่นเดียวกับ Collins และ Jacobson (2003) ที่พบว่าในทุกกรรมวิธีที่พ่นแบคทีเรียลงไปก่อนพ่นเชื้อสาเหตุโรค 1-5 วัน สามารถลดการเกิดโรคลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดเซอร์โคสปอราใน sugar beet ของเชื้อ *B. subtilis* ด้วยการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าส่วนมากมีความสามารถในการลดการเกิดโรคได้ดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีกลไกอื่นที่นอกเหนือจากการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น การสร้างเส้นใยออกมาพันรัด การเข้าครอบครองพื้นที่ที่ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (จิระเดช, 2549) หรือการเข้าไปทำลายภายในเซลล์ของเชื้อโรคด้วย

สำหรับการทดลองครั้งที่ 2 เป็นการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วในระดับห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนปลูก โดยเริ่มทำการทดลองในช่วงต้นเดือนมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงที่แสงแดดจัด อากาศร้อนอบอ้าว ไม่เหมาะต่อการเกิดโรค ทั้งนี้เพราะสปอร์เชื้อราจะไม่งอกหากมีความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือนต่ำกว่า 70 % ตามปกติโรคนี้จะพัฒนาได้ดีหากมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) และช่วงเวลาที่ใบเปียกช้านานเพียงพอ หากผิวใบได้รับความชื้นจากน้ำค้าง ฝน และหมอก เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญที่สร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการงอก (germination) การแทงเข้าสู่ผิวพืช (penetration) การเข้าทำลายพืช (infection) และการสร้างสปอร์ (sporulation) ของเชื้อราสาเหตุโรค ดังนั้นการทดลองในช่วงนี้จึงต้องช่วยสร้างสภาวะที่เอื้ออำนวยกับการเกิดโรคโดยการเพิ่มความชื้นให้มากขึ้นภายในโรงเรือน และพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกครั้ง เพื่อเพิ่มโอกาสในการก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังได้ช่วยปรับสภาพในเรือนทดลองให้ใกล้เคียงกับสภาพเรือนปลูกของเกษตรกรที่มีเชื้อสาเหตุโรคแพร่ระบาดอยู่ ทำให้สามารถเกิดโรคนี้ได้ตลอดทั้งปี (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2548)

อย่างไรก็ดี การทดสอบในครั้งนี้ สามารถยืนยันประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบ ถึงแม้ว่าสภาวะแวดล้อมจะไม่เอื้ออำนวยกับการเกิดโรคเท่าที่ควรและอาจไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เช่นกัน แต่ก็ยังพบว่า กรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทั้งในรูปแบบเดี่ยว หรือใช้ร่วมกัน มีค่าดัชนีการเกิดโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี

ควบคุม โดยที่การปนเชื้อรา *T. harzianum* ทำให้มีค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำสุด เพียง 8.19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งแรก แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *T. harzianum* มีความสามารถในการเจริญและสร้างส่วนขยายพันธุ์ (spore) ได้เร็ว จึงสามารถแข่งขัน (competition) กับเชื้อราสาเหตุโรคได้ แม้ในสภาพอากาศในช่วงฤดูร้อน

สำหรับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ช่วงฤดูร้อน พบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่สูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ ที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวารภรณ์ (2550) ที่พบว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 165 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสของพริก ไม่สูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 165 แบบเดี่ยว ซึ่งถือว่าเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกคโนสของพริก แม้ว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะไม่สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุดแต่ก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เช่นกัน เนื่องจากว่ากลไกการทำงานของเชื้อปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ถ้าหากนำมาใช้ร่วมกันได้ก็มีแนวโน้มทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเพิ่มขึ้นด้วย ถือเป็นการทำงานที่เสริมประสิทธิภาพซึ่งกันและกันได้ (synergistic reaction) เช่นเดียวกับ Duffy *et al.*, (1996) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อรา *T. koningii* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมโรค Take-all ของข้าวสาลี มีผลต่อการเพิ่มผลผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* อย่างเดียว แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. koningii* อย่างเดียว อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยมีผลในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อรา *T. koningii* อย่างเดียว

เมื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 โดยจะมีการสร้าง clear zone เกิดขึ้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้ *Bacillus* sp. TM04 นั้น ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ทำให้เชื้อราสามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เจริญไปคลุมทับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 ได้ โดยไม่มีการสร้าง clear zone ซึ่งแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 สร้างขึ้นไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. dendrobii* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens*

CG06 มีเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นที่มีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกัน ถึงแม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสอง เมื่อใช้ผ่านแบบเดี่ยวนั้นจะมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค และการตรวจปริมาณประชากรเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ผิวใบกล้วยไม้ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 มีผลกระทบกับเชื้อรา *T. harzianum* ส่งผลให้มีจำนวนประชากรเชื้อรา *P. dendrobii* มีปริมาณมากกว่ากรรมวิธีอื่นที่มีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. TM04 จำนวนประชากรเชื้อรา *P. dendrobii* มีปริมาณใกล้เคียงกับกรรมวิธีอื่นที่มีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งแบบเดี่ยวหรือแบบร่วมกัน อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แบบเดี่ยวนั้นมีแนวโน้มในการลดจำนวนประชากรเชื้อรา *P. dendrobii* ได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าไม่จำเป็นที่จะต้องนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคแล้วจะต้องดีเสมอไป สอดคล้องกับเกรียงศักดิ์ (2546) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. 2 สายพันธุ์ร่วมกันในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ต้นงอกและต้นรอดตายไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยว อย่างไรก็ตาม *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคใบปื้นเหลืองได้ดีที่สุด ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกันไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อกันมากนัก และยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำหรับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางสายพันธุ์

การทดลองต่อมา เป็นการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองในช่วงฤดูฝนถึงต้นฤดูหนาว ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค โดยพบว่าในช่วงแรก ทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีระดับการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อสาเหตุโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ต่อมาเมื่อระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อโรคสามารถแพร่กระจายได้ดี สภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยกับการเกิดโรค กรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และพ่นเชื้อโรคมียเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกันนัก แต่กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองครั้งที่ผ่านมานอกจากนี้จะเห็นได้จากกรรมวิธีควบคุมที่ไม่พ่นเชื้อสาเหตุโรค ก็สามารถเกิดโรคได้เช่นเดียวกันกับการทดลองของขวัญเนตร (2550) และ พราวมาส (2550) ที่รายงานว่าการควบคุมที่ไม่พ่นเชื้อสาเหตุโรค ก็สามารถเกิดโรคได้ หากมีการทดสอบในช่วงที่สภาพเหมาะสมกับการเกิดโรค ซึ่งอาจเกิดจากสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคนั้นมีอยู่แล้วในสภาพแวดล้อม ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ไม่พ่นเชื้อโรค ก็สามารถเกิดโรคได้เช่นกันแต่อยู่ในระดับไม่มากนัก

จากการสุ่มตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวใบพืช หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทั้ง 3 การทดลองนั้น พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. dendrobii* ที่ด้านใต้ใบมากกว่า ด้านบนใบ อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่ใบสัมผัสอยู่ตลอด เช่น ฝน ลม แสงอาทิตย์ ตลอดจนสภาพอากาศร้อน หนาวเย็น ที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา อีกทั้งระบบการให้น้ำแบบ สปริงเกอร์ที่ใช้ในโรงเรือนกล้วยไม้ ทำให้เกิดการชะล้างจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้านบนออกไป นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ล้วนแล้วแต่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพ และตั้งรกรากของจุลินทรีย์ทั้งสิ้น นอกจากนี้จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารกำจัดศัตรูพืชไม่ทำให้ประสิทธิภาพและจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลดลง สอดคล้องกับ ผลงานของ Dodd *et al.*, (2004) ที่รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *T. harzianum* ว่า เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ C65 ที่ใช้ในการควบคุมโรค stem-end rot ของกิมจิซึ่งมีสาเหตุจาก เชื้อรา *Botrytis cinerea* สามารถมีชีวิตอยู่บนใบ ดอก และผลของกิมจิได้ตลอดฤดู และการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ C65 หนึ่งครั้งในช่วงต้นฤดูร้อนยังสามารถตรวจพบสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ C65 บนใบและผลกิมจิในช่วงปลายฤดูร้อน ซึ่งในงานทดลองครั้งนี้พบว่า หลังจากพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ไปบนใบกล้วยไม้แล้ว 1 เดือนยังสามารถพบสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มพ่นมากนัก

การตรวจพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่บนผิวใบกล้วยไม้มีมากกว่าเชื้อรา *T. harzianum* อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญและพบมากบริเวณขนใบ (trichome) เส้นใบ (vein) ปากใบ (stomata) และช่องเหนือเซลล์ epidermis ตรงแกนกลางผนังเซลล์ (Andrew, 1992) โดยบริเวณผิวพืช (phylloplane) จะมีการปล่อยสารอาหารออกมาเช่นเดียวกับบริเวณผิวรากพืชจึง ทำให้เชื้อปฏิปักษ์เจริญได้เช่นเดียวกัน ซึ่งนับว่าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ และส่งผลกับการเจริญ และทวิจำนวนของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่อาจชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น และส่งผลกับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* นอกจากนี้ยังพบว่า การทดลองของ Collins *et al.* (2003) ที่ใช้ *B. subtilis* ไอโซเลท BacB ควบคุมการเกิดโรคใบจุดเซอร์โคสปอราของต้น sugar beet ภายใต้อสมมติฐานที่เชื่อว่ากลไกในการควบคุมโรคที่สำคัญคือการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และการเป็นปรสิต (parasitism) ซึ่งตรวจสอบได้จากปริมาณของประชากรแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับประชากรของเชื้อโรค *C. beticola* หากพบแบคทีเรียในปริมาณมาก แสดงว่ากลไกการเป็นปรสิตเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมโรค ถ้าพบในปริมาณที่น้อยกว่า แสดงว่าการสร้างสารปฏิชีวนะเป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมโรค แต่เมื่อตรวจสอบแล้วพบเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท BacB (Rif+) ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันกับเชื้อรา *C. beticola* จึงสรุปได้ว่า กลไกในการควบคุมโรคใบจุดเซอร์โคสปอราใน sugar beet ของ *B. subtilis* ไอโซเลท BacB นั้น

เป็นกลไกอื่นนอกเหนือจากนี้ ซึ่งเชื่อได้ว่ากลไกการลดการเกิดโรคของ sugar beet ดังกล่าวเกิดขึ้นได้จากการชักนำของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้ sugar beet ต้านทานต่อโรค (induced systemic resistance) เป็นไปได้ทั้งในงานทดลองครั้งนี้ เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบใช้หลายกลไกร่วมกันในการควบคุมโรค เช่น การเป็นปรสิต การเข้าครอบครองพื้นที่และแย่งอาหาร รวมทั้งยังชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย

Sequeira (1983) ได้กล่าวไว้ว่า จำนวนสปอร์ต่อแผล เป็นตัวอย่งที่สำคัญต่อการควบคุมโรคมากกว่าขนาดแผล เมื่อนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคบนผิวใบกล้วยไม้พบว่าทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถลดจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบกล้วยไม้ 1 ตารางเซนติเมตรลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อโรค (+Pd) โดยกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 นั้นสามารถลดการสร้างสปอร์ลงได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าจำนวนสปอร์นั้นไม่ใช่ปัจจัยสำคัญประการเดียวที่บ่งชี้ถึงการลดการเกิดโรค เนื่องจากกรรมวิธีที่พ่นสารเคมีแมนโคเซบนั้นเป็นกรรมวิธีที่เกิดโรคน้อย แต่มีจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบกล้วยไม้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆ เช่นเดียวกับงานทดลองของพราวมาส (2550) ในกรณีของโรคราใบดำของมะเขือเทศ

จากการทดลองครั้งที่ 3 ที่มีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนใบและวัสดุปลูกติดต่อกัน 10 สัปดาห์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ในวัสดุปลูก (กาบมะพร้าว) ได้ดี โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง (10^4 - 10^6 CFU/น้ำจากกาบมะพร้าว 1 มิลลิลิตร) เนื่องจากกาบมะพร้าวสามารถอุ้มน้ำและเก็บความชื้นได้ดี ซึ่งเหมาะกับการเจริญและตั้งรกรากของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งยังมีการพ่นทุกสัปดาห์ จึงทำให้พบในปริมาณที่มาก นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันอีกด้วยว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ ทั้งเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไม่ได้เป็นตัวเร่งให้เกิดการย่อยวัสดุปลูกให้เร็วยิ่งขึ้น เพราะกาบมะพร้าวยังคงสภาพไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่ได้พ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในกรรมวิธีควบคุมที่พ่นเชื้อโรค มีจำนวนช่อดอก ความยาวช่อดอก และจำนวนดอกต่อช่อน้อยที่สุด ในขณะที่ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ถือได้ว่า ถ้ามีความยาวช่อดอกมาก ทำให้มีจำนวนดอกต่อช่อมากไปด้วย แม้จะมีจำนวนช่อดอกต่อต้นไม่มากนัก ในขณะที่ถ้ามีความยาวช่อดอกสั้น จำนวนดอกต่อช่อก็จะน้อย แต่สามารถให้จำนวนช่อดอกต่อต้นมากกว่า อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารกำจัดศัตรูพืช ทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพมากขึ้นกว่ากรรมวิธีที่พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า รากของต้นกล้วยไม้ในทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งแบบเดี่ยว และร่วมกับ

สารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช มีความยาวรากและมีจำนวนรากเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่พ่นสารเคมีแมน โคเซบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อตรวจสอบการเข้าครอบครองส่วนรากกล้วยไม้ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CG06 สามารถเข้าครอบครองรากทั้งโคนราก กลางราก และปลายราก ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับเชื้อรา *T. harzianum* ที่เข้าครอบครองรากได้ดี โดยเฉพาะเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 แม้ว่าจะมีการล้างรากด้วยสารละลาย 1.575 % sodium hypochlorite (Clorox 30 %) นาน 5 นาที โดยสามารถเข้าครอบครองโคนราก กลางราก และปลายรากได้ดีตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 สามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ของฝักรากกล้วยไม้ได้ ซึ่งอธิบายได้จากการทดลองของดวงใจ (2548) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 สามารถคงทนอยู่ในรากได้แม้จะผ่านการล้างด้วยสารละลาย 0.525 % sodium hypochlorite นาน 5 นาที แสดงว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 มีความสามารถในการเจริญครอบครองรากแตกงาได้ดี เช่นเดียวกับรายงานของ Intana (2003) และแสดงให้เห็นว่าเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 สามารถเจริญอยู่ภายในเซลล์ของฝักรากแตกงาได้ เช่นเดียวกับงานทดลองของ Harman *et al.* (2004a) ซึ่งทุกการทดลองสนับสนุนตรงกันว่าเชื้อรา *T. harzianum* ที่สามารถครอบครองรากพืชได้ จะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มความสามารถของรากพืชด้วย

จากผลการทดลองที่ได้ มีความเป็นไปได้ว่า การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งแบบเดี่ยว และร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชไปที่ใบกล้วยไม้และวัสดุปลูก มีกลไกการชักนำให้พืชต้านทานต่อโรค (induced systemic resistance) และส่งเสริมการเจริญของพืชเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องด้วย ตามรายงานของ Yedidia *et al.* (1999) และ Yedidia *et al.* (2000) ที่กล่าวถึงการเจริญครอบครองฝักรากแตกงาด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สามารถกระตุ้นลักษณะ electron dense และการสร้าง callose ที่ช่วยให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรงต้านทานต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรค หรือกระตุ้นให้พืชมีการผลิต PR-protein ชนิด chitinase และ β -1,3 glucanase ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในแตกงาได้ และการเปลี่ยนแปลงของ PR-protein ในพืชมีการผลิตมาเพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรค เช่นเดียวกับรายงานของ Harman (2004b) ที่ว่า เชื้อรา *T. harzianum* T22 มีความสามารถในการเข้าครอบครองราก รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากข้าวโพด Mo17 และกระตุ้นให้ข้าวโพดสร้างเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น ทั้งยังลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ด้วย

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งเป็น PR-protein ที่เชื่อว่าเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย β -1,3- glucan และ chitin ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนใหญ่ และอื่น ๆ ที่เชื่อว่าเป็นส่วนสนับสนุนในการเข้าทำลายพืชของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าใบยอดของกล้วยไม้ในช่วง 0 - 10 วัน หลังจากพ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase มีกิจกรรมที่เกิดขึ้นที่ค่าไม่คงที่ มีความผันแปรตลอดการทดลอง อาจเกิดจากกลไกการรักษาสสมดุลเพื่อให้ดำรงชีวิตอยู่รอด เพราะในสภาพปกตินั้นไม่ได้ถูกรุกรานจากเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิด พืชจะสร้างกลไกการป้องกันตัวเองขึ้นมาเพื่อด้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคนั้นได้ (Mauch *et al.* , 1988) ในการศึกษาครั้งนี้กรรมวิธีที่พ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่า specific activity ของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม ซึ่งคล้ายคลึงกับการทดลองของอารีรัตน์ (2550) ที่พบว่า การพ้นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย ในรูปสปอร์แขวนลอย กรณีแบบเดี่ยว พร้อมกันหรือพ้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนพ้นเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้ โดยพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3 glucanase และ chitinase ทุกวันตลอดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าสอดคล้องกับ Robeti *et al.*, (2003) ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. นั้นสามารถชักนำให้พืชป้องกันตัวเองจากโรคใบจุดเซอร์โคสปอรา บนต้น sugar beet สาเหตุจากเชื้อรา *C. beticola* ได้ โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะไปเพิ่มการแสดงออกของยีนไคไคเนส (chitinase) และเอนไซม์ peroxidase ให้สูงขึ้นในพืช นอกจากนี้ Robeti *et al.*, (2004) ได้ศึกษาถึงกลไกการป้องกันตัวเองของ sugar beet ต่อจากเชื้อรา *C. beticola* และพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ peroxidase และ chitinase ในกรรมวิธีที่พ้นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 3 วัน ในพันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทานมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ จากนั้นในวันที่ 4 – 5 หลังจากการปลูกเชื้อ จะพบว่าเป็นช่วงที่กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยจะพบในพันธุ์อ่อนแอกว่าพันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทาน โดยกิจกรรมเอนไซม์เหล่านี้พบได้น้อยมากในกรรมวิธีที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อรา *Trichoderma* spp. และไม่ฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรค , กรรมวิธีที่ฉีดพ่นแต่เชื้อรา *Trichoderma* spp. และกรรมวิธีที่ฉีดพ่นแต่เชื้อสาเหตุโรค จึงเป็นการพิสูจน์ได้ว่าเป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อสาเหตุโรค และเป็นไปได้ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. จะชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดเซอร์โคสปอรา บนต้น sugar beet สาเหตุจากเชื้อรา *C. beticola* ได้ดี

อย่างไรก็ดี แบคทีเรียปฏิปักษ์ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ในกล้วยไม้เช่นกัน สอดคล้องกับ Bargabus *et al.*, (2002) ที่ตรวจพบเอนไซม์ chitinase, β -1,3 glucanase และ peroxidase ในต้น sugar beet ของกรรมวิธีที่ใช้

B. mycooides ไอโซเลท BacJ เพื่อลดการเกิดโรคใบจุดเซอร์โคสปอรา ในขณะที่ตรวจไม่พบ เอนไซม์ดังกล่าวในกรรมวิธีควบคุม และ Bargabus *et al.*, (2004) ที่ตรวจพบเอนไซม์เดียวกันเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกรรมวิธีที่ใช้ *B. pumilus* ไอโซเลท 203 - 6 และ 203 - 7 ที่สามารถลดอาการของโรคได้ประมาณ 70% ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้ *B. mycooides* (BacJ) และสารเคมี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อราปฏิปักษ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันไปในแต่ละวัน และแต่ละสายพันธุ์ก็มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3 glucanase และ chitinase ขึ้นมาเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคบนใบกล้วยไม้ได้

จากการทดลองที่ผ่านมา มีรายงานการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืชทั้งใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวมากมาย โดยพบว่ามียาของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืชเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่อาการโรคลดลง ความต้านทานที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นทั้งความต้านทานเฉพาะที่และความต้านทานทั้งต้น การทดลองในครั้งนี้อาจถือได้ว่าเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น คือทำการทดลองเพื่อดูแนวโน้มกิจกรรมของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ในดินพืชสามารถผันแปรไปได้ตลอดเวลา ด้วยปัจจัยหลายประการ เช่นสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ การให้น้ำ ให้อุณหภูมิ หรือทำให้พืชเกิดบาดแผล ก็สามารถทำให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปได้ทั้งสิ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ การเจริญเป็น germ tube และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ CG30, CG06 และ TM04 ตามลำดับ เทียบเท่ากับสารเคมีแมนโคเซบ ในขณะที่การใช้สารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีเช่นกัน

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดการเกิดโรคได้ดี คือ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01), *T. harzianum* (T50), เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* (CG06) และ *Bacillus* sp. (TM04) เท่าเทียมกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ (80 WP) ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ได้ 71.78, 71.26, 63.29 และ 62.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม หลังพ่นเชื้อรา *P. dendrobii* 35 วัน จึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไว้ทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 โดยมีการสร้าง clear zone เกิดขึ้น ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TM04 นั้นไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว

การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองในสภาพเรือนปลูก พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก เมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองได้ดีไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ เมื่อทำการพ่นทุกสัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 5 ครั้ง

การประยุกต์ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองในสภาพเรือนปลูก ด้วยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบและวัสดุปลูกติดต่อกัน 10 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่า การใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับ

สารละลายปุ๋ยและสารกำจัดศัตรูพืช สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 แบบเดี่ยว เมื่อพ่นเชื้อราปฏิบัติก่อนพ่นเชื้อราสาเหตุ ส่วนการใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อย่างเดียวโดยไม่พ่นเชื้อสาเหตุโรค สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ แม้ว่าสภาวะแวดล้อมเหมาะกับการเกิดโรคและมีเชื้อราสาเหตุโรคแพร่ระบาด นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้ช่อดอกกล้วยไม้มีความยาวเพิ่มมากขึ้น จำนวนดอกต่อช่อมากขึ้น รากของกล้วยไม้ยาวมากขึ้นและยังทำให้มีจำนวนรากเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

การทดสอบการชักนำให้กล้วยไม้ต้านทานต่อโรคใบปื้นเหลืองด้วยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase ในใบยอดกล้วยไม้หลังการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase ตลอดการทดลอง แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือเชื้อโรคสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้

ข้อเสนอแนะ

การพ่นเชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบเป็นเหลืองของกล้วยไม้ให้ได้ผล ควรพ่นก่อนการเกิดโรค และอาจต้องพ่นอย่างต่อเนื่องประมาณสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในกรณีที่พบว่าเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝนจนถึงฤดูหนาว ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เพื่อให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญเข้าครอบครองผิวใบ ตลอดจนกระตุ้นความต้านทานโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ได้

ควรแนะนำชาวสวนผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ให้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์การค้า CB-Pin-01 เพื่อควบคุมโรคในกล้วยไม้ นอกเหนือจากประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบเป็นเหลืองได้แล้ว ยังสามารถควบคุมโรคคอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย สาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* โรคเน่าแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โรคเน่าเข้าไส้หรือโรคแก้ผ้าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora plamivora* โดยสามารถใช้เชื้อรา *T. harzianum* ได้ตลอดทั้งปีหรือทุกฤดูกาลเพื่อป้องกันการเกิดโรคและลดความรุนแรงของโรคได้

นอกจากนี้ยังสามารถใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับสารละลายปุ๋ยและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ โดยสามารถผสมและพ่นพร้อมกันได้โดยไม่มีผลกระทบต่อจำนวนประชากรและประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ในขณะที่หากต้องการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นก็สามารถทำได้ แต่ต้องมีการศึกษาว่าสามารถผสมรวมกันได้หรือไม่ ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แบบเดี่ยวสามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. นอกจากนี้เชื้อรา *T. harzianum* ยังสามารถเจริญที่ผิวใบกล้วยไม้ได้ดี ลดจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยเพิ่มความยาวช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ และจำนวนช่อดอก เพิ่มความยาวรากและจำนวนรากอีกด้วย ทั้งยังสามารถเข้าครอบครองรากได้ดี

การศึกษาการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโดยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในกล้วยไม้ เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่แน่นอน ควรตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อย่างต่อเนื่องช่วงระยะเวลาหนึ่งที่ยาวนานพอสมควร โดยการทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้น เพื่อดูแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์เท่านั้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. **คู่มือการปฏิบัติปลูกเลี้ยงกล้วยไม้**. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ, กองส่งเสริมพืชสวน, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 103 น.
- กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2548. **โรคไม้ดอก**. กรุงเทพฯ. 132 น.
- กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 2544. **คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด**. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว องค์การคุรุสภาฯ. กรุงเทพฯ. 90 น.
- เกรียงศักดิ์ แสงศรีคำ. 2546. **การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับเชื้อรา *Gliocladium* sp. เพื่อควบคุมโรคพืชในดินโดยชีววิธี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
- ขวัญเนตร หินอ่อน วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และ วิชชุพร จันทร์ศรี. 2548. การฉีดพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อลดการเกิดโรคราดำของใบมะเขือเทศ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ภายใต้สภาพเรือนพลาสติก. น. 35 ใน **บทคัดย่อการประชุมวิชาการอารักขาแห่งชาติ ครั้งที่ 7**.
- ขวัญเนตร หินอ่อน. 2550. **ศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคราดำสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิตรารพรรณ พิสิถ. 2536. **การผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก**, น. 16 – 32. **คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- จิตรารพรรณ พิสิถ. 2542. **การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 74 น.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 323 น.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2544. การผลิตและวิธีใช้ไตรโคเดอร์มาชนิดสด ควบคุมโรคพืช. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 32น.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วย เทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. น. 114-122 ใน รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 40th มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2546. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา, น. 12-53. ใน จิระเดช แจ่มสว่าง, บรรณาธิการ. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืช โดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชมพูนุท บุญราชแขวง. 2550. อิทธิพลของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อ การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงใจ เสรีไพบุลย์ทรัพย์. 2548. การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดในต้นแตงกวาที่ได้รับการชักนำ ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2542. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 49 น.

- นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. **คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด**. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผัก ไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 49 น.
- บรรเจิด อินหว่าง และ จิระเดช แจ่มสว่าง. 2529. การควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* Kuehn) โดยจุลินทรีย์จากดินเกษตรกรรม, น. 173-185. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 24 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.
- พราวมาศ เจริญรักษ์. 2550. การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคราใบดำของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พราวมาศ เจริญรักษ์, จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2547. ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวใบมะเขือเทศ ในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria solani*. น. 50 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 1 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแพงฤทธิวงศ์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2542. **ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย**. กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. 284 น.
- ลาวัลย์ วีระพงษ์ แสงมณี ชิงดวง และ สุอาภา ดิสถาพร. 2540. **เอกสารวิชาการเชื้อราไตรโคเดอร์มา**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 37 น.
- วราภรณ์ บุญเกิด. 2550. การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วราภรณ์ สุทธิสา. 2544. การคัดเลือกและใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วราภรณ์ สุทธิสา. 2545. การคัดเลือกและใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วารุณี มณีนาถ. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสได้สูง และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2540. ปลุกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์, สมาคมพฤกษชาติแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ. 414 น.
- สุณิรัตน์ สีมะเดื่อ. 2540. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคครากเฝ้าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และลดการเกิดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30: 603-635.
- Anju, P. 1994. Antagonism of *Trichoderma* against fungal pathogen and their enzyme production. *Advance in Plant Sciences* 7(1): 147-153.

- Arwiyanto, T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyamu, S. and Takikama, Y. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** 60: 288-294.
- Bargabus, R. L., N. K. Zidack, J. E. Sherwood, and B. J. Jacobsen. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere - colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. **Physiol. Molec. Plant Pathol.** 61: 289-298.
-
- . 2004. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. **Biol. Control.** 30: 342-350.
- Benhamou, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. **Phytopathology.** 82: 1185-1193.
- Besson, F. C. Chevanet and G. Michel. 1987. Influence of the Culture Medium on the Production of Iturin A by *Bacillus Subtilis*. **J.Gen.Microbiol.** 133: 767-772.
- Bigirimana, J., G. De Meyer, J. Poppe, Y. Elad and M. Höfte. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Med. Fac. Landbouww.** 62: 1001-1007.
- Caesar-TonThat, T. C. and R. T. Lartey. 2003. Mechanisms of Inhibition of *Cercospora beticola* by Antagonistic *Trichoderma* species. **Abstracts, 8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch, New Zealand. pp34.

- Cerato C., P. L. Burzi, S. Galletti and R. Ghedini. 2003. Comparative effect of sugar beet foliar treatment with *Trichoderma* spp. on cercospora leaf spot control, phyllosphere microbial population dynamic and sucrose yield. Abstracts, **J. Plant Pathol.** 85 (4, Special issue) pp.287.
- Chaverri, P., L. A. Castlebury., J. S. Gary and M. G. David. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 27: 302-313.
- Collins, D. P. and B. J. Jacobsen. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biol. Control.** 26:153-161.
- 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. **ASC Conference proceedings Series. Pest Management: Biologically Based Technologies.**
- _____ and K. F. Baker. 1983. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.** The Amer. Phytopathol. Soc., Minnesota.
- Correa, A. 1995. *In vitro* inhibitory activity of trichozinianines on *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Cryptogamine Mycologia** 16(3):185-190.
- Danielson, R. M. and C. B. Davey. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* sp. **Soil Biol. Biochem.** 5: 505-515.
- Deighton, F. C. 1987. New species of *Pseudocercospora* and *Mycocovellosiella* and new combination into *Pseudocercospora* and *Phaeoramularia*. **Trans Brit Mycol. Soc.** 88: 365-391.

- De Meyer, G., J. Bigirimana, Y. Elad, and M. Hofte. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **Eur. J. Plant Pathol.** 104: 279–286.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 157: 41.
- Dodd, S. L., R. A. Hill and A. Stewart. 2004. Monitoring the survival and spread of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* (C65) on kiwifruit using a molecular marker. **Australian Plant Pathology.** 33: 189-196.
- Duffy K. B., A. Simon and D. M. Weller. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with Fluorescent *Pseudomonas* for control Take-all on Wheat. **Phytopathology.** 86: 188-194.
- Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Hennis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology.** 73: 85-88.
- El-Gholl, N. E., S. A. Alfieri, W. H. Ridings, and C. L. Schoulties. 1982. Growth and sporulation in vitro of *Cercospora apii*, *Cercospora arachodicola*, *Cercospora kikuchii* and other species of *Cercospora*. **Can. J. of Bot.** 60: 862-868.
- Frevel, D. R. and H. W. Spurr. 1977. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. **Phytopathology.** 67: 930-932.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Ann. Rev. Phytopathol.** 26: 75-91.

- Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., van Montagn, M., and Herrera-Estrella, A. 1991. Hydrolytic extracellular enzymes of *Trichoderma* : specific induction of a basic proteinase, pp. 193-195. In **New approaches in biological control of soil-borne diseases**, Copenhagen, Denmark.
- Godtfredsen, W. O. and Vangedal, S. 1965. Trichodermin a new sesquiterpene antibiotic. **Acta. Chem. Scand.** 19: 1088.
- Harman, G. E., Chet, I., and Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma harzianum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology.** 71: 569-572.
- _____. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.** 84: 377-393.
- _____, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004a. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Rev. Microbiol.** 2: 43-56.
- _____, R. Petzoldt, A. Comis and J. Chen. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology.** 94: 147-153.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases : The history and evolution of current concepts. **Plant Dis.** 87: 4-10.
- Hubbard, J. P., Harman, G. E., and Hadar, Y. 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biocontrol agent, *Trichoderma hamatum* on pea seeds. **Phytopathology.** 73: 655.

- Intana, W. 2003. **Selection and Development of *Trichoderma* spp. for High Glucanase, Antifungal Metabolite Producing and Plant Growth Promoting Isolates for Biological Control of Cucumber Damping-off caused by *Pythium* spp.** Ph.D. thesis, Kasetsart University. 202 p.
- _____, C. Chamswarn, W. Intanoo, K. Sivasithamparam and C. Hongprayoon. 2003. Potential of *Trichoderma harzianum* isolates for growth promotion and biocontrol of damping-off of cucumber. **Thai J. Agric. Sci.** 36: 305-318.
- _____, C. Chamswarn, W. Intanoo, C. Hongprayoon. and K. Sivasithamparam. 2003. Use of mutant strains for improved efficacy of *Trichoderma harzianum* for controlling cucumber damping-off. **Thai J. Agric. Sci.** 36: 429-439.
- Jee, H. J., C. G. Nam and C. H. Kim. 1988. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red pepper. Isolate of antagonist and evaluation of antagonist activity *in vitro* and in greenhouse. **Korean J. of Plant Pathology.** 4: 4, 305 – 312.
- Johnson, L.F. and E.A. Curl. 1972. **Methods for research on the ecology of soil borne Plant Pathogens.** Burgess Publishing Company, Minnisota.
- Korsten, L., E. E. De Villiers, F. C. Wehner, and J. M. Kotzé. 1997. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. **Plant Dis.** 81: 455-459.
- Lartey, R. T. and Caesar-TonThat, T. C. 2003. Antagonism of *Cercospora beticola* by *Laetisaria arvalis* involves laccase degradation of cercosporin. **Abstracts, 8th International Congress of Plant Pathology.** pp34.
- Lin, A. 1994. Trichodermin a new antifungal agent from *Trichoderma viride* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Jour. of Antibiot.** 47: 799-805.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mauch, F. 1989. Antifungal hydrolases in pea tissue: I Purification and characterization of two chitinase and two 1,3-beta-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiol.** 87: 325 - 333.
- Meyer, C. E. and Reusser, F. 1967. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. **Experienta** 23: 85.
- McIvor, O. 1990. **Studies on *Cercospora* leaf spot of orchids in Trinidad and Tobago.** Abstracts, West Indies Univ., St. Augustine (Trinidad and Tobago).
- Nelson, N. 1944. A Photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Ooka, T., Shimojima, Y., Akimoto, T., Senoh, S., and Abe., J. 1966. A new antibacterial peptide "Suzukacillin". **Agric. Biol. Chem.** 30: 700.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23:23-54.
- Penyalver, R., Vicedo, B. 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.
- Pyke, T. R. and Dietz, A. 1966. U-21, 963, a new antibiotic I. Discovery and biological activity. **App. Microbiol.** 14: 506.

Reusser, F. 1967. Biosynthesis of antibiotic U-22, 324, a cyclic polypeptide. **J. Biol. Chem.** 242: 243.

Ridthaisong, W. 2005. **Intergrated Control of Pythium Damping-off and Root Rot of Tomato with *Trichoderma* spp. and Calcium Chloride or Silicon.** M.S. thesis, Kasetsart University. 89 p.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the gene *Trichoderma* . **Mycol. Papers. C. M. I.** 116: 1-56.

Riker, A.J. and R.S. Riker. 1936. **Introduction to Research on Plant Disease.** John. S. Swift. Co. St. Louis. Mo.

Roberti R., S. Marinello, C. Cerato, P. L. Burzi and A. Cesari. 2003. Chitinase and Peroxidase isoenzymes in sugar beet leaves treated with *Trichoderma* against *Cercospora beticola*. Abstracts, **J. Plant Pathol.** 85 (4, Special issue) pp 278.

_____. A. Veronesi, and A. Cesari. 2004. Possible involvement of induced systemic resistance in sugar beet against *Cercospora beticola* by leaf treatment with *Trichoderma* sp., pp 112. In **Abstract , Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs and their integration in agricultural systems.** Trentino, Italy.

Rodriguez-Kabana, R. 1969. Enzymatic interactions of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in mixed soil culture. **Phytopathology.** 59: 910.

_____, R. and Curl, E. A. 1968. Saccharase activity of *Sclerotium rolfsii* in soil and the mechanism of antagonistic action by *Trichoderma viride*. **Phytopathology.** 58: 985.

_____, R., Kelley, W. D. and Curl, E. A. 1978. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. **Can J. Microbiol.** 24: 487.

- Schaad, N.W. 1980. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.**
The Amer. Phytopathol. Soc., Minnesota.
- 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.
- Sequeira, L. 1983. Mechanisms of induced resistance in plants. **Ann. Rev. Microbiol.** 37: 51-79.
- Sontiriat, P., P. Phitakpraiwan, W. Choobanroong and P. Giatgong. 1980. **Plant pathogenic *Cercospora* in Thailand. Plant Pathology and Microbiology Division,** Dept. of Agriculture. Kasetsart University. 51 p.
- Thomson, J. 1987. The use of agrocin-producing bacteria 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.
- Tzen, S. L., B. K. Tung, and J. G. Tsay. 1992. Etiology and chemical control of *Pseudocercospora* leaf spot of *Dendrobium* orchids. Abstracts, **Plant Protection Bulletin.** 34: 8-16.
- Uchida, J. Y. 1994. Diseases of orchids in Hawaii (Feature Article). **Plant Dis.** 78 : 220-224.
- Veloukas, T., G. A. Bardas, G. S. Karaoglanidis and K. Tzavella-Klonari. 2007. Management of tomato leaf mould caused by *Cladosporium fulvum* with trifloxystrobin. **Crop Protection.** 26: 845-851.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology.** 22: 837-845.

Yedidia, I., N. Benhamou and I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1061–1070.

_____, N. Benhamou, Y. Kapulnik and I. Chet. 2000. Induction and accumulation of PR protein activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiol. Biochem.** 38: 863–873.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

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

1. สูตรอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) (Riker and Riker, 1936)

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นลูกเต๋า	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่งกับน้ำให้สุกก่อน กรองเอาแต่น้ำมันฝรั่ง มาผสมกับน้ำสะอาด ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ก่อนเติมส่วนผสมอื่นลงไป แล้วต้มให้วุ้นละลายอีกครั้งหนึ่ง

2. สูตรอาหาร NGA (Nutrient Glucose Agar) (Schaad, 1980)

Beef extract	3	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร

3. สูตรอาหาร NGB (Nutrient Glucose Broth)

Beef extract	3	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร

4. สูตรอาหาร Martin's Medium (Johnson and Curl, 1972)

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
Bacto Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Rose bengal	0.032	กรัม
Agar	12	กรัม
Water	1	ลิตร
Streptomycin	1	กรัม

ละลาย rose Bengal ในน้ำก่อนผสมกับสารตัวอื่น จากนั้นค่อยนำไป autoclave ส่วน Streptomycin ให้ใส่ก่อนจะเทอาหาร

5. สูตรอาหาร SMA (Synthetic Mucor Agar)

Glucose	40	กรัม
Asparagine	2	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม
Thiamin Chloride	0.5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร

6. สูตรอาหาร V-8 Agar

V-8 juice	200	มิลลิลิตร
CaCO_3	0.3	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร

การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด

อุปกรณ์

- เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA
- เครื่อง Autoclave
- ถุงพลาสติกทนร้อน (8 x 12 นิ้ว)
- เครื่องชั่ง
- ปลายข้าว 100 กรัม ต่อน้ำ 50 ml
- Cork borer
- คอขวดพลาสติก
- สำลี, ขางวง

วิธีการ

- ตักปลายข้าว 100 กรัม ใส่ถุงพลาสติกเติมน้ำ 50 ml
- นึ่งที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

20 นาที

- ใช้ Cork borer เจาะเชื้อแต่ละสายพันธุ์ นำมาใส่ลงถุงข้าวที่นึ่งจนเย็นแล้วถุงละ 3-5 ชิ้น
- เขย่าให้หัวเชื้อกระจายทั่วถุง
- กดข้าวในถุงให้แผ่กระจาย คึงบริเวณกลางถุงให้มีอากาศเข้า
- บ่มเชื้อ 2 วัน ในบริเวณที่อากาศไม่ร้อน ให้ได้รับแสงสว่าง 6-10 ชั่วโมงต่อวัน
- เมื่อครบ 2 วัน บีบขย้าก้อนข้าวให้แตก บ่มเชื้อต่อ 4-5 วัน

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การเตรียม 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5

เตรียมโดยผสมสาร A จำนวน 14.8 มิลลิลิตร กับสาร B จำนวน 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ให้ได้ 200 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

สาร A

0.2 M Glacial acetic acid	11.55	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

สาร B

0.2 M Sodium acetate	27.2	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

การเตรียม 0.05 M Sodium acetate buffer pH 5.5 โดยทำการเจือจาง 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 ในน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และปรับค่า pH ด้วย 6N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

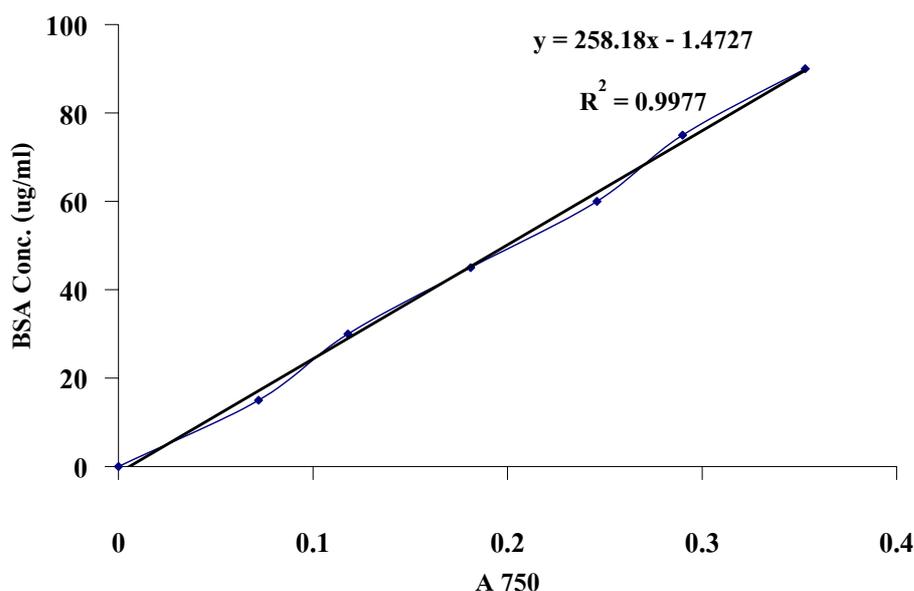
2.1 สารเคมีที่ใช้

สารละลาย Alkaline Copper

เตรียมโดยผสม 4 % (W/V) Na_2CO_3 , 0.2 M NaOH, 1 % (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 2% (W/V) Sodium Potassium tartrate ในอัตราส่วน 49:49:1:1 โดยเตรียมก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2.2 การเตรียม standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75, และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมน้ำกลั่น Alkaline Copper จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น folin-ciocalteu phenol reagent (Lowry *et al.* 1951) เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (Absorbance 750 nm = A 750 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างโปรตีนและค่า A 750



ภาพผนวกที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944)

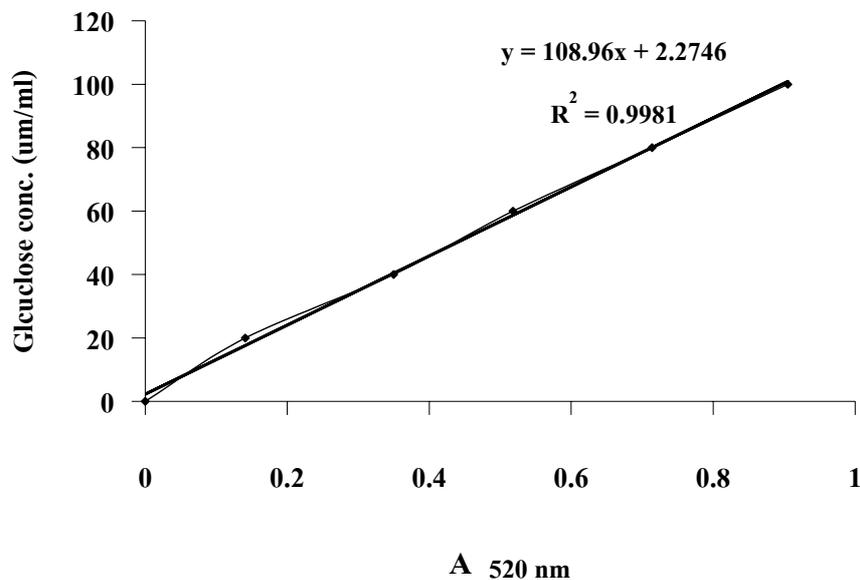
3.1 สารเคมีที่ใช้

3.1.1 copper reagent เตรียมสารละลาย Cu reagent (Alkaline Copper Solution) โดยละลาย Na_2CO_3 24 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลายแล้วเติม Potassium Sodium Tartrate 12 กรัม คนให้ละลายจึงเติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 10% ลงไป 40 มิลลิลิตร (เวลาเติมน้อยๆ เติมน้อยๆ และคนไปด้วย) จากนั้นจึงเติม NaHCO_3 16 กรัม คนให้ละลาย เติมสารละลาย Na_2SO_4 (Na_2SO_4 180 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 สัปดาห์ กรองเอาตะกอนออก

3.1.2 Nelson reagent เตรียมสารละลาย Nelson reagent (Nelson Solution) โดยละลาย ammonium molybdate 50 กรัมในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium arsenate (sodium arsenate 6 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 คืน กรองเอาตะกอนออก

3.2 การเตรียม standard curve ของน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุ ในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นโดยทันที โดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (Absorbance 520 nm = A 520 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่า A 520



ภาพผนวกที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)

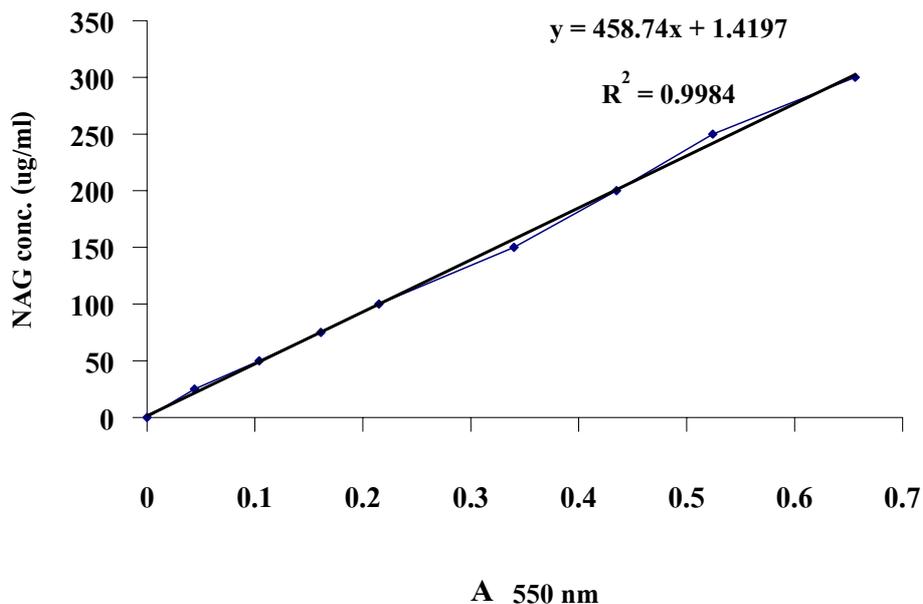
4. การวิเคราะห์ปริมาณ N-acetylglucosamine

4.1 สารเคมีที่ใช้ เหมือนกับสารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาล glucose (ข้อ 3.1.1 และ 3.1.2)

4.2 การเตรียม standard curve ของ N-acetylglucosamine

4.2.1 เตรียมสารละลาย N-acetylglucosamine เข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำเย็นทันทีโดยแช่น้ำเย็นจัด เติม nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Absorbance 550 nm = A 550 nm) เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ N-acetylglucosamine และค่า A 550

4.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอย่างเหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetylglucosamine ข้างต้น จำนวนปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานนั้น



ภาพผนวกที่ 3 กราฟแสดงมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกรพินธุ์ ทนกล้า
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 สิงหาคม 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปี 2546 ระดับปริญญาตรี วท.บ.(เกษตรศาสตร์) ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาพืชไร่ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ตำแหน่งปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	ปี 2548 นำเสนอผลงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ครั้งที่ 2 ปี 2550 นำเสนอผลงานการประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	