



วิทยานิพนธ์

การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus*
spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรค
แอนแทรคโนสของพริก

APPLICATION OF *Trichoderma harzianum* IN COMBINATION
WITH *Bacillus* spp. FOR THE CONTROL OF *Colletotrichum*
gloeosporioides, A CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN
CHILI

นางสาววราภรณ์ บุญเกิด

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

Application of *Trichoderma harzianum* in Combination with *Bacillus* spp. for the Control of *Colletotrichum gloeosporioides*, A Causal Agent of Anthracnose in Chili

นางผู้วิจัย นางสาววราภรณ์ บุญเกิด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ด.)

กรรมการ

(อาจารย์กรุง สัตตะณี, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เข้มสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา
Colletotrichum gloeosporioides สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

Application of *Trichoderma harzianum* in Combination with *Bacillus* spp. for the Control of
Colletotrichum gloeosporioides, A Causal Agent of Anthracnose in Chili

โดย

นางสาววราภรณ์ บุญเกิด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2550

วารกรณ์ บุญเกิด 2550: การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรมการ
ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์จรเดช แจ่มสว่าง, Ph.D. 101 หน้า

จากการทดสอบด้วยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 2 สายพันธุ์ คือ CB-Pin-01 และ T50 และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก เชื้อราดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองด้วย อย่างไรก็ตามจากการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ไม่มีผลยับยั้ง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ค่อนข้างดี การใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 หรือ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 D13 และ *B. amyloliquefaciens* DGg-13 เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกด้วยวิธี detached fruit ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าทุกกรรมวิธีลดการเกิดโรคลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกได้ไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* เมื่อใช้ร่วมกับสารกรองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำกว่าการใช้เชื้อสดในรูปสปอร์และเซลล์แขวนลอย

การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 หรือ D13 ร่วมกันหรือสลับกับเชื้อรา *T. harzianum* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรค 50-94% และไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 หรือ D13 อย่างเดียว แต่จะมีประสิทธิภาพดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* อย่างเดียว กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ในทุกกรรมวิธี

การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลง 2 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคบนผลพริกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ปฏิบัติ การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริกได้สูงที่สุด โดยสูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 แบบเดี่ยว อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ปรากฏว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 แบบเดี่ยว โดยการใช้เชื้อร่วมกันไม่ได้มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 แต่อย่างใด

Warapon Bunkoed 2007: Application of *Trichoderma harzianum* in Combination with *Bacillus* spp. for the Control of *Colletotrichum gloeosporioides*, A Causal Agent of Anthracnose in Chili.
Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology.
Thesis Advisor: Associate Professor Chiradej Chamswarnng, Ph.D. 101 pages.

From dual culture test, *Trichoderma harzianum* strains T50 and CB-Pin-01 and *Bacillus* sp. BB165 were highly effective to inhibit *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose in chili. These antagonists were effective in controlling anthracnose under screen house condition. However, in the test of antagonistic interaction, *T. harzianum* growth was inhibited by *Bacillus* sp. BB165 but not *Bacillus* sp. D13. Efficacy of spores suspension of antagonistic fungi, *T. harzianum* strain T50 and CB-Pin-01 in combination with cell suspension of antagonistic bacteria, *Bacillus* spp. strain BB165, D13 and *B. amyloliquefaciens* DGg13 were evaluated for the reduction of anthracnose incidence on chili fruits by detached fruit technique. The results revealed that all treatments significantly reduced anthracnose incidence as compared to the control. Combinations of *T. harzianum* with each *Bacillus* spp. did not provide much differences in disease control when compared with the use of each antagonist alone. By using detached fruit technique, combining use of culture filtrates derived from two antagonists gave less disease reduction efficacy as compared to the use of fresh spore or cell suspension.

Bacillus spp. isolates BB165 and D13, were applied in combination or alternately with *T. harzianum* for controlling anthracnose on chili fruits. These applications effectively suppressed anthracnose by 50-94 % which were non significantly different as compared to the solely use of *Bacillus* sp. BB165 or D13. However, greater disease suppression was obtained when compared with the solely use of *T. harzianum*. *Bacillus* sp. BB165 provided greater disease suppression than the application with *Bacillus* sp. D13 in all treatments.

Results from two field trials revealed that all antagonists reduced anthracnose incidence as compared to the control. Sole application of *Bacillus* sp. BB165 gave the highest disease suppression on chili fruit which was greater than the sole application of *T. harzianum* T50 or CB-Pin-01. However, when *T. harzianum* T50 or CB-Pin-01 was applied in combination with *Bacillus* sp. BB165, suppression of anthracnose on chili fruits was non significantly different as compared to the solely used of *Bacillus* sp. BB165. Combinations of these antagonists did not enhance the disease suppression capability of *Bacillus* sp. BB165.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาเกี่ยวกับการวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. วรณวิไล อินทนู กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์กรุง สีตะชนิ กรรมการวิชาการ และ รศ.ดร.จุริยรัตน์ ลิสมิทธิ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุน และส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญา โท-เอก ปีการศึกษา 2549 ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร-กำแพงแสนทุกท่าน พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพทุกคนสำหรับคำแนะนำ ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ คุณปู่ คุณย่าและครูอาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้สนับสนุน เป็นกำลังใจ ให้ตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

วราภรณ์ บุญเกิด
สิงหาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	65
สรุปและข้อเสนอแนะ	77
สรุป	75
ข้อเสนอแนะ	77
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	78
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิกิริยา	92
ภาคผนวก ข สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	95
ภาคผนวก ค สูตรสารละลายธาตุอาหาร (ปุ๋ยน้ำ) ที่ใช้ในการทดลอง	98
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	101

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน 32
2	ประสิทธิภาพแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน 34
3	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองหลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน 37
4	ผลการทดสอบสารทุติยภูมิของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ด้วยเทคนิค Dialysis membrane บนอาหาร PDA 39
5	ผลของสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อ <i>Trichoderma harzianum</i> ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA 41
6	ผลของสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการยับยั้งสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA 42
7	การยับยั้งเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture บนอาหาร PDA หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน 43
8	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ด้วยวิธี Detached fruit technique หลังจากปลูกเชื้อโรค 7 วัน 46
9	ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. หลังจากผสมกันที่ระยะเวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง 48
10	ประสิทธิภาพสารกรองของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสด้วยวิธี Detached Fruit technique หลังจากปลูกเชื้อโรค 7 วัน 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ที่ใช้ร่วมกันหรือสลับกับเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน	53
12	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp.BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)	57
13	ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp.BB165-M และเชื้อสาเหตุโรคบนผลพริกในสภาพแปลง ครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)	59
14	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย.-พ.ค. 2550)	62
15	ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BB165-M และเชื้อสาเหตุโรคบนผลพริกในสภาพแปลง ครั้งที่ 2 (เม.ย.-พ.ค. 2550)	63
ตารางผนวกที่		
ก1	สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลอง	93
ก2	สายพันธุ์เชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดลอง	94

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน	33
2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน	35
3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองหลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน	38
4 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ทดสอบด้วยเทคนิค Dialysis membrane บนอาหาร PDA	40
5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture บนอาหาร PDA หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน	44
6 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. เมื่อใช้ร่วมหรือสลับกันในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน	54
7 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550) หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน	58
8 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ปรากฏบนผลพริกจากการทดสอบในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)	60
9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> และเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย.-พ.ค. 2550)	64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

B	= เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.
C	= เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
cm	= เซนติเมตร
cm ²	= ตารางเซนติเมตร
CFU	= จำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (colony forming unit)
ml	= มิลลิลิตร (milliliter)
NGA	= อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose agar)
NGB	= อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose broth)
PDA	= อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)
PDB	= อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose broth)
ppm	= ส่วนในล้านส่วน (part per million)
T	= เชื้อรา <i>Trichoderma</i>
WP	= ผงเปียกน้ำ
μm	= ไมโครเมตร (micrometer)
%	= เปอร์เซ็นต์
<	= เครื่องหมายน้อยกว่า

**การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุม
เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก**

**Application of *Trichoderma harzianum* in Combination with *Bacillus* spp. for the
Control of *Colletotrichum gloeosporioides*, A Causal Agent of Anthracnose in
Chili**

คำนำ

พริกเป็นพืชที่มนุษย์ทั่วโลกรู้จักกันมานานแล้ว พริกมีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมากทั้งรูปร่างและขนาดของผล รสชาติ ความเผ็ด ตั้งแต่เผ็ดน้อยไปจนถึงเผ็ดมาก ดังนั้นจึงมีการนำพริกมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร เช่น ใช้เป็นผัก เครื่องเคียง เครื่องปรุงรส เครื่องเทศและผลิตเป็นอุตสาหกรรม ในประเทศไทยพริกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากคนไทยนิยมอาหารรสเผ็ด พริกจึงเป็นส่วนประกอบหลักในการใช้ประกอบอาหารหลายชนิด

ปัญหาสำคัญในการปลูกพริกคือปัญหาเรื่องแมลงและไร และยังพบปัญหาเรื่องโรคอื่นๆ อีกหลายชนิด ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของผลพริก โดยเฉพาะโรคกุ้งแห้งหรือโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทั้งผลสีเขียวและผลสุกสีแดง แต่ปกติจะแสดงอาการรุนแรงบนพริกสุกสีแดงทำให้เกิดแผลยุบตัวบนผลพริก เริ่มแรกแผลมีขนาดเล็กแต่ต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้นเมื่ออุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมก็จะสร้าง acervulus บนผลพริกให้กำเนิดสปอร์จำนวนมากและสามารถแพร่กระจายไปยังผลอื่น เชื้อรานี้สามารถเข้าทำลายแบบแอบแฝงอยู่กับผลพริกตั้งแต่ก่อนเก็บเกี่ยวและมักจะแสดงอาการภายหลังเก็บเกี่ยวแล้วในขณะการขนส่งหรือการวางตลาด ซึ่งมีรายงานว่าพริกแสดงอาการภายหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วสูงถึง 41 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมล็ดที่แยกมาจากผลที่เป็นโรคมีความงอกต่ำเฉลี่ย 38 เปอร์เซ็นต์ และจะทำให้เกิดการแพร่ของเชื้อไปยังต้นกล้าปกติต้นอื่นๆ ทำให้เกิดโรคมามากขึ้น นอกจากนี้เชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังสามารถทำลายพืชได้หลายชนิด เนื่องจากมีพืชอาศัยกว้าง และไม่เฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย

การควบคุมโรคในปัจจุบันนิยมใช้สารเคมีซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ได้ผลดีและรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีมีข้อจำกัดคือถ้ามีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อโรคต้านทานต่อสารเคมี

ชนิดนั้นๆ ทำให้มีสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมและในผลพริกซึ่งจะเป็นผลเสียต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้การใช้สารเคมีฉีดพ่นยังมีผลทำให้ถูกปฏิเสธจากประเทศผู้นำเข้า และต้องสูญเสียมูลค่าการส่งออกพริกเพิ่มขึ้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสของพริกโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สองชนิดร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพร่วมกันอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีขึ้นหรือสามารถป้องกันเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิดมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก
2. เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในระดับห้องปฏิบัติการ
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในระดับแปลง

การตรวจเอกสาร

พริก (Chilli หรือ hot pepper) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae สกุล *Capsicum* spp. โดยทั่วไปเป็นได้ทั้งพืชล้มลุก ไม้พุ่ม และไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในแถบร้อนของทวีปอเมริกาและแพร่กระจายไปยังทวีปต่างๆ ทั่วโลก พริกมีประโยชน์ทั้งทางอาหาร ทางยา และทางการเป็นไม้ประดับ เนื่องจากเป็นแหล่งของพลังงาน แร่ธาตุ และเป็นแหล่งของวิตามินเอ ซี และอี โดยเฉพาะวิตามินซี ที่พบมากกว่าในพืชอื่นๆ สำหรับรสเผ็ดร้อนของพริกที่เกิดจากสาร capsaicin ที่อยู่ในแกนกลางของผลพริกมีสรรพคุณ ทำให้เลือดไหลเวียนดี เจริญอาหาร ขับลม ละลายเสมหะ และขับเสมหะ ขับเหงื่อ แก้อาเจียนและบิด นอกจากนี้พริกยังเป็นส่วนประกอบของยาหลายชนิด (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2538) และเนื่องจากในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์พริกออกมามาก พริกบางชนิดมีขนาดเล็ก ผลดก ก้านผลชี้ขึ้น และมีผลพริกหลากสี จึงเหมาะที่จะนำมาเป็นไม้ประดับ (Peirce, 1987)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พริกเป็นพืชที่มีอายุหลายฤดู ลักษณะลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 1-1.5 ฟุต มีระบบรากลึกประมาณ 70 เซนติเมตร สามารถขยายออกทางด้านข้างได้ถึง 110 เซนติเมตร เมื่อดำเนินหลักมีใบ 9-11 ใบ จะเริ่มออกดอกซึ่ง มักพบทั้งดอกเดี่ยวและหลายดอกที่ข้อตรงมุมที่เกิดใบหรือกิ่ง การแตกกิ่งเจริญเติบโตเป็นแบบ dichotomous ใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับกัน ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลมหรือกลมมน ขนาดใบมีต่างๆ กัน มีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยกลีบรอง ดอกมีลักษณะเป็นพู่ 5 พู่ มีกลีบดอกสีขาว 5 กลีบ (แต่อาจจะมี 4-7 กลีบก็ได้) บางพันธุ์กลีบดอกจะเป็นสีม่วง โดยปกติจะมีเกสรตัวผู้อยู่ 5 อัน ซึ่งเท่ากับจำนวนกลีบดอก เกสรตัวผู้มีสีม่วงอมฟ้า สีม่วง สีคราม และสีน้ำตาลอมเหลือง แดงออกมาจากตรงโคนของกลีบดอก อับเกสรตัวผู้จะแยกตัวเป็นกระเปาะเล็กๆ ยาวๆ ส่วนเกสรตัวเมียมีก้านชูเกสร 1 อัน มีสีขาว สีขาวอมเหลือง และสีม่วง ส่วนยอดของเกสรตัวเมียมีรูปร่างเหมือนกระบอก ห้วนมน รังไข่เป็นแบบ superior ovary มีอยู่ 3 พู่ หรืออาจมี 2 หรือ 4 พู่ก็ได้ แต่จะมี ovule จำนวนมาก เมื่อดอกบานก้านชูเกสรตัวเมียอาจอยู่เท่ากันเหนือกว่า หรือต่ำกว่าเกสรตัวผู้ ถ้าก้านเกสรตัวเมียอยู่เหนือกว่าเกสรตัวผู้จะทำให้พริกมีโอกาสผสมข้ามได้สูง ดอกจะบานนาน 2-3 วัน และเกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมเกสร ในวันแรกที่ดอกบาน ผลเป็นแบบ berry ที่มีลักษณะเป็นกระเปาะ มีฐานที่จับผล (peduncle) สั้นและหนา โดยปกติผลอ่อนมักชี้ขึ้น เมื่อผลแก่อาจชี้ขึ้นหรือห้อยลง ผลมีลักษณะตั้งแต่แบน กลมยาว จนถึงพองอ้วน

ต้น ขนาดผลมีตั้งแต่ขนาดผลเล็กไปจนกระทั่งผลขนาดใหญ่ ผนังผล (pericarp) มีตั้งแต่บางไปจนกระทั่งหนา ขึ้นกับพันธุ์พริก เมื่อผลสุกอาจเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นแดง หรือเหลือง พร้อมๆ กับการแก่ของเมล็ดในผลควบคู่กันไป ผลพริกมีความเผ็ดแตกต่างกัน บางพันธุ์เผ็ดจัด บางพันธุ์ไม่เผ็ดเลย โดยภายในผลมีสารที่ก่อให้เกิดรสเผ็ดคือ capsaicin ซึ่งเป็นสาร volatile phenolic compound มีมากบริเวณรก (placenta) ของผล (Gill and Vear, 1980; Andrews, 1984; Nonnecke, 1989)

ฐานของผลอาจแบ่งออกเป็น 2-4 ห้องซึ่งอาจเห็นได้ชัดในพริกหวานทั่วไป แต่ในบางพันธุ์อาจดูเหมือนว่าภายในผลมีเพียงห้องเดียวโดยตลอด เนื่องจาก setae ไม่เจริญยาวตลอดถึงปลาย เมล็ดมีรูปร่างกลมแบน มีสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล เมล็ดจะเกิดเกาะรวมกันอยู่ที่รก ซึ่งมีตั้งแต่โคนไปจนถึงปลายผล เมล็ดพริกมีขนาดโตกว่าเมล็ดมะเขือเทศ ตามมาตรฐานของเมล็ดพริก เช่นเมล็ดพริกหวาน 1 กรัม ควรจะมี 166 เมล็ดขึ้นไป ส่วนพริกเผ็ดมีขนาดเมล็ดเล็กลง เช่น 256 เมล็ด ต่อกรัม (เฉลิมเกียรติ, 2540)

การจำแนกชนิดของพริกตามหลักพฤกษศาสตร์ยังมีความสับสนอยู่มาก นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ให้ความเห็นแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เพราะพริกมีความแตกต่างกันมากทั้งลักษณะ ก้าน ใบ ดอก และผล พันธุ์พริกที่ใช้ปลูกในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ ทั้งพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นการค้า และพันธุ์พื้นเมืองต่างๆ เช่น พันธุ์ห้วยสีทน หัวเรือ บางช้าง เป็นต้น ซึ่งพริกที่ปลูกในเมืองไทยส่วนใหญ่อยู่ใน 2 กลุ่มคือ

1. *Capsicum annuum* L. ได้แก่ พริกมัน พริกหนุ่ม พริกหยวก พริกหวาน พริกชี้ฟ้า
2. *Capsicum frutescens* L. ได้แก่ พริกขี้หนูสวนพันธุ์ต่างๆ

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพริก อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 21-29.5 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่พริกยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 18 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พริกต้องการดินที่มีความชื้นสูง มีการระบายน้ำดี ความเป็นกรดเป็นด่าง 6.5-7.5

โรคแอนแทรคโนสของพริก

โรคแอนแทรคโนสของพริกพบระบาดทั่วไปในสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1690 แต่ยังไม่ทราบสาเหตุ ต่อมา Higgin ที่มณฑลรัฐ Georgia และ Smith ที่ Delaware ได้ศึกษาพบว่าโรคนี้นี้เกิดกับพริกได้ทุกระยะและทุกส่วนของต้นพริก โดยจะเกิดรุนแรงมากกับพริกที่แก่จัด โรคนี้เป็นกับพริกทุกชนิดในประเทศไทย พริกชี้ฟ้าอ่อนแอต่อโรคมากกว่าพริกชี้ฟ้า เมื่อนำพริกที่เป็นโรคไปตากแห้งพริกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด (ศุภลักษณ์, 2536)

โรคแอนแทรคโนสของพริกมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 4 species คือ *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. capsici* (Syd.) Butl., *C. acutatum* Simmonds และ *C. coccodes* (Wallr.) Hughes นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อราเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสกับมะเขือเทศอีกด้วย ในประเทศไทยพบเชื้อรา 2 ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก คือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ซึ่งมีลักษณะของเชื้อและการก่อให้เกิดอาการบนผลพริกดังนี้

C. capsici สปอร์มีสีครีมอ่อนหรือไม่มีสี รูปร่างเป็นแบบพระจันทร์เสี้ยว ไม่มีผนังกัน ขนาดประมาณ 2.42 - 11.13 ไมครอน (ศุภลักษณ์, 2536) เมื่อเข้าทำลายผลพริกทำให้เกิดแผลที่มีลักษณะยุบตัวลง มีรูปร่างเป็นรูปร่างกลมหรือวงรี ขอบแผลสม่ำเสมอ มีจุดสีดำซึ่งเป็นกลุ่มของ acervulus กระจายอยู่บนแผลมากมาย มี setae สีน้ำตาลดำฐานโป่ง เชื้อรา *C. capsici* เจริญเติบโตได้ดีและเข้าทำลายพืชได้มากในช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95% ขึ้นไป หากมีฝนตกติดต่อกันหลายวันอาการของโรคจะพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว ผลผลิตที่เป็นโรคหากเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูงจะเน่าอย่างรวดเร็ว (ศักดิ์, 2537)

C. gloeosporioides มีสปอร์รูปทรงกระบอกปลายมน เซลล์เดียว ขนาดประมาณ 9-24x3 - 4.5 ไมครอน สปอร์เกิดบน conidiophore ใน fruiting body แบบ acervulus เส้นใยมีผนังกัน เมื่อเข้าทำลายผลพริกทำให้แผลมีลักษณะเป็นรูปยาวรี ยุบตัวลง บริเวณแผลมีสีเหลืองส้ม ซึ่งเป็นกลุ่มของ acervulus ของเชื้อ ที่ไม่มี setae ถ้าอายุมากสีจะคล้ำลงเล็กน้อย (สมศิริ, 2521) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA มีลักษณะกลมขอบเรียบ เส้นใยสีขาวเทา พูเล็กน้อย

บุญญาวดี (2540) ศึกษาความเสียหายเนื่องจากโรคแอนแทรคโนสกับผลพริกหลังเก็บเกี่ยว พบว่าผลพริกที่ไม่แสดงอาการจะมีการเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดยเมื่อเข้าทำลายพริกแล้วจะแสดงอาการบนผลพริกแตกต่างกัน การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนผลพริกจะแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และเชื้อรา *C. capsici* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุดในทุกพันธุ์ที่ทำการสุ่มมา

ความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นการเข้าทำลายโดยตรง (direct penetration) สปอร์ของเชื้อราบนผลพริกที่เป็นโรคจะปลิวตามลมหรือถูกชะล้างติดไปกับเครื่องมือเพาะปลูกไปยังต้นปกติ สปอร์ที่ตกลงบนผิวพืชจะงอก germ tube แผ่เป็นแผ่นบางๆ แนบกับผิวพืช จาก germ tube ก็จะสร้าง appressorium เป็นโครงสร้างพิเศษใช้สร้าง penetration peg แทะทะลุผ่านชั้นคิวติเคิลไปยังผนังเซลล์ แล้วแทงเข้าไปทาง cell lumen ที่ส่วนปลาย penetration peg ของเชื้อจะมีการปล่อยเอนไซม์ pectolytic enzyme และ cellulolytic enzyme ออกมาย่อย pectic substance และ cellulose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์แยกออกจากกัน (Meon, 1980) ทำให้เนื้อเยื่อยุบตัวและเกิดอาการเน่า (รัตตะ, 2542) อาการเริ่มจากจุดชำ ำุ่ม และขยายใหญ่ขึ้นจนติดกับแผลอื่น ต่อมาผลจะแห้งเหี่ยวจนหงิกงอ ถ้ามีสภาพความชื้นสูงจะเกิดอาการเน่าและสร้าง acervulus ซึ่งเป็นแหล่งให้กำเนิดสปอร์ (Higgin, 1926) เช่นเดียวกับ Pring *et al.*, (1995) รายงานการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. capsici* บนส่วน hypocotyl ของถั่วฝักยาว พบว่าสปอร์ของเชื้อรางอกภายในเวลา 16 ชั่วโมง แล้วสร้าง setum ขวางตรงกลางสปอร์ หลังจากงอก germ tube แล้ว 24-30 ชั่วโมง จะสร้าง appressorium ผ่านเข้าไปภายในและเจริญอยู่ภายใต้ผนังของอีพิเดอร์มิส หลังจากนั้น 6 วันจึงเริ่มสร้าง acervulus บนผิว hypocotyl ที่มีอาการเน่า acervulus พัฒนามาจากการรวมกลุ่มของเส้นใยภายใต้คิวติเคิลแล้วโป่งออก ภายใน acervulus มีสปอร์อยู่เป็นจำนวนมากและมี setae ปรากฏออกมา

ในประเทศเกาหลีมีรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีอยู่ 2 strain คือ strain G และ strain R โดย strain G มีความรุนแรงมาก สามารถเข้าทำลายได้ทั้งในผลที่มีสีเขียวและผลสุกสีแดง ไม่สร้าง perithecium และ setae ส่วน strain R มีความรุนแรงน้อยและก่อให้เกิดความเสียหายกับผลสุกสีแดง พบว่ามีการสร้าง perithecium และ setae (Kim, 1986) ในปัจจุบันพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* strain G ทำความเสียหายอย่างมากกับผลพริกทั่วประเทศเกาหลี (Kim *et al.*, 1990)

ความสามารถในการเกิดโรคบนผลพริกพันธุ์ต่างๆ

เชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* สามารถทำให้เกิดโรคบนผลสุกได้กับพริกทุกพันธุ์ แต่ความรุนแรงต่างกัน Higgin (1926) พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความรุนแรงกับพริกยักษ์ เช่นเดียวกับสมศิริ (2521) ที่พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพริกยักษ์ แสดงอาการปานกลางกับพริกชี้ฟ้าและพริกเหลือง แต่เป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกชี้หนู ส่วนเชื้อรา *C. capsici* จะทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพริกหยวกและพริกเหลือง แสดงอาการปานกลางกับพริกชี้ฟ้า แต่เป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกชี้หนู พริกบางช้างและพริกเหลืองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคสูง เช่นเดียวกับรายงานของอุดม (2530) ส่วนพริกช่อ มข. อ่อนแอ้อยที่สุด

การเข้าทำลายแบบแฝง

Dickman and Alvares (1982) ศึกษาการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และพบว่าเชื้อนี้เข้าทำลายได้ตั้งแต่ในระยะผลอ่อนของมะละกอ โดยสามารถแทงเข้าไปโดยตรงในชั้น cuticle และเชื้อยังคงเจริญอยู่ได้จนกระทั่งผลเข้าสู่ระยะของการสุกจึงจะแสดงอาการของโรค แอนแทรกโนสออกมาให้เห็น ต่อมา Dickman *et al.*, (1983) ได้ทำการศึกษาต่อและพบว่าหลังการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* 2 สัปดาห์ เชื้อราจะสร้างเอนไซม์ cutinase ออกมาย่อยผนังเซลล์บนผิวมะละกอ นอกจากนี้ยังพบว่าการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในผลสตอเบอร์รี่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่อยู่ในสภาวะอุณหภูมินั้นๆ เช่น 2-3 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 6-17 วันที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และพบว่าเชื้อรา *C. acutatum* มีระยะเวลาของการเข้าทำลายแบบแฝงสั้นกว่าเชื้อรา *Colletotrichum* สปีชีส์อื่นๆ (King *et al.*, 1997) Jeffries *et al.*, (1990) ศึกษาพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สร้าง appressoria ที่สมบูรณ์และเริ่มเข้าทำลายพืชได้ภายใน 9-72 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ แต่ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมหรือพืชอาศัยยังเจริญไม่เต็มที่ทำให้เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไม่สามารถเข้าทำลายได้ appressoria จะเป็นโครงสร้างในการพักตัวเนื่องจากมีผนังหนาจึงเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายแบบแฝงในผลไม้ได้ Adikaram *et al.*, (1982) ศึกษาการเข้าทำลายแบบแฝงของ *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพริกสีเขียวที่ยังไม่สุก พบว่ามีบางสปอร์สามารถเข้าทำลายผลพริกได้แต่เป็นส่วนน้อย เนื่องจากผลพริกสร้างสาร phytoalexin ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อราคือ capsicannol ซึ่งเกิดขึ้นหลังปลูกเชื้อ 18 ชั่วโมง และมีปริมาณมากที่สุดหลังปลูกเชื้อ 4 วัน บริเวณผิวของเนื้อเยื่อที่มี

การปลูกเชื้อจะมีการสะสมสารความเข้มข้นสูง ซึ่งมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาร capsaicinol ตรวจไม่พบในผลปกติและพบสารสะสมเล็กน้อยถ้าผลพริกมีบาดแผล ส่วนในผลสุก หลังปลูกเชื้อบนผล พบว่ามีการสะสมของ capsaicinol อย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณของสารในผลพริก สุกมีเพียงแค่จำกัดการพัฒนาของเชื้อเท่านั้น ความเข้มข้นของสาร capsaicinol ในผลสุกต่ำกว่าผลสีเขียว และเมื่อผลสุกมากขึ้นความเข้มข้นของสาร capsaicinol ลดลงจนไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทำให้ผลพริกแสดงอาการของโรคเพิ่มขึ้น

การเข้าทำลายเมล็ด

Smith and Crossan (1958) รายงานว่าเชื้อรา *C. capsici* เป็น seed borne แสดงอาการเป็น โรค 48 เปอร์เซ็นต์ บนเมล็ดพริก ต่อมา Grover and Benson (1970) ได้ศึกษาเพิ่มเกี่ยวกับการเป็น seed borne ของเชื้อนี้ พบว่าเมล็ดที่ไม่มีแผลบนเปลือกแต่ได้มาจากผลที่เป็นโรคจะมีการติดเชื้อบนเมล็ด 58 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ต้นอ่อนแอตาย 42 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่มาจากผลที่เป็นโรคจะมีการติดเชื้อบนเมล็ด 96 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ต้นอ่อนแอตาย 87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจะสร้างกลุ่มของ acervulus เป็นจำนวนมากบนต้นอ่อนที่ตายซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดสปอร์แพร่ไปยังดินปกติ ในประเทศไทย Juangbhanich and Chana (1975) รายงานว่าเมล็ดที่นำมาจากผลเป็นโรคมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อถึง 28.5 เปอร์เซ็นต์ และในปี พ.ศ. 2521 สมศิริ ได้ศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อรา *C. capsici* ผ่านทางเมล็ดจากบริเวณใต้ผลที่เป็นโรคซึ่งมีเมล็ดที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการมีการติดเชื้อภายในเมล็ดได้ถึง 49.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเมล็ดที่มีอาการของโรคมาตรวจหาเชื้อที่อยู่ภายในเมล็ดพบว่ามีปริมาณของเชื้อที่เกิดบนเมล็ดถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้าตายถึง 42 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสโดยการใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้แก่ สารเคมีประเภทไม่ดูดซึม เช่น zineb, maneb, captan และสารประกอบทองแดง โดยใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกัน (McMillan, 1972; Freat, 1985) Cordoba (1992) พบว่าการใช้ dithiocarbamate มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส สามารถยื้อระยะเวลาในการขนส่งทางเรือออกไปได้นาน ส่วนสารกำจัดเชื้อราพวก copper พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า dithiocarbamate มากในสภาพที่มีการเข้าทำลายของโรคสูง

ส่วนสารเคมีประเภทดูดซึมเช่น carbendazim, benomyl, prochloraz สามารถควบคุมโรคได้ผลดี ดังเช่นรายงานของ Sohi *et al.*, (1973) ได้ทดลองใช้สารเคมี benomyl ความเข้มข้น 500 ppm และ thiabendazole เข้มข้น 900 ppm พบว่าให้ผลดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส บนผลมะม่วงโดยการแช่ผลมะม่วงแล้วเอาขึ้นพักกับการแช่ผลนาน 10 นาที ให้ผลในการควบคุมโรคแตกต่างกัน ส่วน captan, aureofungin และ formalin ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคนี้บนผลมะม่วง ในขณะที่ Kuo (2001) รายงานว่าสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในไต้หวัน ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้แก่สารเคมี benzimidazole, dithiocarbamate, prochloraz, difenoconazole และ myclobutanil จากการศึกษาของ Eckert *et al.*, (1979) และ Ben (1975) รายงานว่าสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole เหมาะที่จะใช้ในการควบคุมโรคของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากสามารถแทรกซึมลงไปในส่วน wax บนผิวผลถึงชั้นที่เกิดการเข้าทำลายได้ พบว่าสาร benomyl มีประสิทธิภาพในการแทรกซึมลงไปใต้ผิวผลสูงกว่า thiabendazole, carbendazim และ thiophanate-methyl จึงมีผลให้ benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีด้วย (Eckert, 1983) McMillan (1972) รายงานว่าการผสม benomyl กับสารจับใบให้ผลในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดีและจัดเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าชนิดอื่น Carlile (1988) ทดสอบสาร prochloraz ร่วมกับสาร benomyl ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ

Santos *et al.*, (2002) รายงานว่าการใช้สารเคมี propiconazole, bitertanole, imazalil และ hexaconazole ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมี propiconazole สามารถลดการเกิดโรคในสภาพเรือนทดลองได้ 32-54 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดสอบในระดับแปลง การนำท่อนพันธุ์ของสตรอเบอรี่ไปจุ่มในสารเคมี carbendazim, bitertanol และ thiabendazole สามารถลดการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ McMillan (1999) รายงานว่าการใช้สารเคมี Dithane M45 อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ benlate ในการฉีดพ่นทุกๆ สัปดาห์จนกระทั่งก่อนเก็บเกี่ยว 14 วัน สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของลิ้นจี่ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการใช้น้ำ Folicur อย่างเดียว และ Folicur ร่วมกับ Dithane สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ดีที่สุด นอกจากนี้ การใช้สารเคมี cinnamaldehyde ความเข้มข้น 30 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุในผลเงาะหลังเก็บเกี่ยวได้ (Sivakumer *et al.*, 2002)

Lewis *et al.*, (2004) รายงานว่าการใช้สารฆ่าเชื้อรา pyraclostrobin (Cabrio) ร่วมกับ ethylenebisdithiocarbamate (Manex) หรือ Chlorothalonil (Bravo Ultrex) อย่างเดียว หรือใช้ Manex ร่วมกับ copper hydroxide หรือการใช้ pyraclostrobin กับ boscolid จะช่วยลดการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสของ bell pepper ที่เกิดจากเชื้อรา *C. acutatum* ในผลพริกที่แก่เต็มที่ นอกจากนี้การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราในกลุ่ม strobilurin ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับ maneb หรือ acibenzolar-s-methyl สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้

Giffer (1973) ได้ศึกษาความต้านทานของเชื้อโรคแอนแทรคโนสต่อสารเคมีประเภท ดูดซึมและไม่ดูดซึม ผลการศึกษาพบว่า *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยต้านทานต่อสาร benomyl เมื่อมีการใช้ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวมากเกินไป (Jeffries *et al.*, 1990; Spalding, 1982) Reddy *et al.*, (1980) รายงานว่าเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกต้านทานต่อ copper sulphate และ dithane M-45 ได้ถึง 500 ppm นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกจาก 4 แหล่งที่มีการปลูกพริกในประเทศมาเลเซียซึ่งมีการใช้สารเคมี benomyl แบบฉีดพ่นอย่างสม่ำเสมอ พบว่าเชื้อรา *C. capsici* จาก 3 แหล่งมีความต้านทานต่อสารเคมี benomyl ที่ความเข้มข้นสูงถึง 1000 µg/ml (Sarian, 1989)

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญและสามารถแข่งขันการใช้อาหารบนผิวใบ ดอก หรือผลของพืชได้ การดำรงชีวิตของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสโดยจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อราพบว่า nonpathogenic strain *Colletotrichum magna* เมื่อเข้าครอบครองพืชจะมีลักษณะเป็น endophyte ซึ่งจะไปขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ มีการศึกษาทั่วไปในการควบคุมโรคของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของกล้วยได้ โดยการเข้าไปเป็นปรสิตภายในเส้นใยของเชื้อราและสร้างสารปฏิชีวนะ โดยสังเกตได้จากการเกิด clear zone รวมทั้งมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์และการสร้าง germ tube ด้วย (Mortuza, 1997) เชื้อรา *Trichoderma* spp. 3 isolate คือ Ti2 Ti17 Ti25 ที่แยกได้จาก rhizosphere ของ *Passiflora edulis* และ *T. harzianum* isolate T-25 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ต่อต้าน

C. gloeosporioides ทุก isolate สามารถควบคุมโรคผลเน่าของเสาวรสและจำกัดบริเวณที่เกิด necrosis รอบๆ รอยแผลได้ ทุก isolate โดย Ti17 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุม *Glomerella cingulata* ในพีช (Rocha and Oliveira, 1998)

Koomen and Jeffries (1993) แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จาก ช่อดอก ใบ และผลของมะม่วงทั้งหมด 648 isolate ประกอบด้วยแบคทีเรีย ยีสต์ และ filamentous fungi เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ความสามารถในการงอกของ conidia และความสามารถในการพัฒนาของแผลโรคแอนแทรคโนส พบว่ามี แบคทีเรีย 2 isolate คือ isolate 204 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Bacillus cereus* และ isolate 558 ซึ่งจำแนกได้ เป็น *Pseudomonas fluorescens* สามารถยับยั้งการงอก conidia ของ *C. gloeosporioides* และการ พัฒนาของแผลโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงได้ ส่วนกลไกของแบคทีเรียที่สามารถลดการ พัฒนาของแผลโรคแอนแทรคโนสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานการสร้างสารปฏิชีวนะทั้งที่ ระบายได้ และระบายไม่ได้ รวมทั้งการเป็นปรสิต

จากการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคแอนแทรคโนส ในมะม่วง พบว่าการใช้ *T. harzianum* (CB-Pin-01) เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จาก ใบ ดอก และผิวผลของมะม่วง โดยการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนและหลัง การปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าการฉีดพ่น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ให้ผลในการควบคุมโรคดีกว่า การฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในทุก ๆ กรรมวิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต BB133, BB167 และ *T. harzianum* (CB-Pin-01) ให้ผลในการควบคุมโรคได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ benomyl ทั้งในวิธีการวางและการฉีดพ่นเชือบนใบมะม่วง นอกจากนี้ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ยังสามารถ ยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ทั้งยังทำให้ germ tube ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เกิดการบวมพอง (ประคอง, 2547)

การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคพืชมีมา นานกว่า 30 ปี และมีการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ออกจำหน่ายตั้งแต่ปี 1989 ซึ่ง ชีวภัณฑ์ที่ ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ ชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยส่วนใหญ่จะนำมาใช้ในการ ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในดิน แต่ในระยะหลังเริ่มมีการศึกษาเพื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชกับส่วนที่เหนือดินของพืชด้วย เช่นหน่อไม้ฝรั่ง สำหรับการนำเชื้อ รา *Trichoderma* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีรายงานการทดลองใช้ชีวภัณฑ์

TRICHODEX ในการควบคุมเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตอเบอรี่ (Freeman *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาของ ดนัย (2545) ที่รายงานผลการทดลองว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร PDA ได้ผลดี แต่จากการทดสอบบนผลลำไย พบว่าทุกไอโซเลทไม่มีประสิทธิภาพในการลดเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค สำหรับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก จิริสสา (2546) ได้ทดลองใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin 01 ควบคุมเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก และพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเกิดแผลแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* ได้เท่ากับการใช้สารเคมีและยังพบว่าสารกรองของ *T. harzianum* CB-Pin 01 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก จากการทดลองของ He *et al.*, (2003) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-2 and BS-1 ที่แยกได้จากใบและต้นพริกสามารถควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของต้นกล้าพริกได้ 81.5-93.3 เปอร์เซ็นต์ และ 66.1-79.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส บนผลพริกได้ 80.0-100 เปอร์เซ็นต์ และ 60.0-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้ง 2 isolate สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าพริกด้วย และการศึกษาของ Sariah, (1994) ซึ่งได้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ รวมทั้งทำให้เส้นใยมีรูปร่างผิดปกติไป โดยทำให้เส้นใยหนาขึ้น และมีช่องว่างเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากเชื้อสร้างสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทำให้ลดการเข้าทำลายและลดจำนวนแผลที่เกิดขึ้นได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ จิริสสา (2546) ที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ สารกรองของแบคทีเรียดังกล่าวสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดี และมีผลทำให้เส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะผิดปกติไป

การใช้เชื้อาร่วมกับเชื้อแบคทีเรียในการควบคุมโรค

การศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เริ่มมีการศึกษา

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา ซึ่งมีทั้งการใช้เชื้อแบคทีเรียร่วมกับแบคทีเรีย เชื้อราร่วมกับเชื้อรา และเชื้อรา ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย เช่น การศึกษาของ Matthias (2004) ซึ่งศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ระดับยีนระหว่าง เชื้อรา *T. atroviride* กับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และพบว่าโดยปกติเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม chitinase เช่น endochitinase และ glucosaminadase และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะเช่น 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดมาเลี้ยงรวมกันพบว่าสาร DAPG จาก เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* ช่วยกระตุ้นให้ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ N-acetyl-β-D-glucosaminadase ใน *T. atroviride* สร้างเอนไซม์ดังกล่าวออกมามากขึ้น แต่จะยับยั้งการทำงานของ ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ endochitinase ในขณะเดียวกันสารกรองจากเชื้อรา *T. atroviride* ก็ ส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างสาร DAPG ในแบคทีเรีย และไม่มีผลในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่า การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ร่วมกันอาจจะมี ปฏิสัมพันธ์กันทั้งด้านบวกและด้านลบ อย่างไรก็ตามมีหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากกว่าหนึ่งชนิดสามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าหรือเท่ากับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิด นั้นๆ อย่างเดียว เช่น การศึกษาของ Whipps (2001) ซึ่งรายงานถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในบริเวณรอบๆ รากพืชที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดร่วมกัน ซึ่ง พบว่าในหลายๆ กรณีมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งอย่าง เดียว เช่น การใช้เชื้อรา *T. koningii* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. chlororaphis* 30-84 หรือ *P. fluorescens* Q2-87 แล้วสามารถยับยั้งการเกิดโรค take-all ของข้าวสาลีได้ดีกว่าการใช้เชื้อรา *T. koningii* อย่าง เดียว (Duffy et al., 1996) การใช้เชื้อรา *T. virens* GL-3 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในดิน พบว่าทำให้ต้นพริกมีอัตราการรอดตายมากกว่าการใช้จุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเดียวย (Mao et al., 1998) การใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* Fo47 ซึ่ง ไม่ก่อให้เกิดโรค ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* WCS358 สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lini* สาเหตุโรคเหี่ยวของต้นป่านได้ดีกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว (Duffy et al., 1996)

สำหรับงานทดลองที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ก็มีการศึกษาเพื่อควบคุมโรครากเน่าในระยะต้นกล้าของยาสูบที่ปลูกทั้งแบบธรรมดาและปลูกในระบบ Hydroponics เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี พบว่าสามารถลดการเป็นโรคโคนเน่าระยะต้น กล้าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Pythium* spp. และ *Rhizoctonia* spp. ได้ 98.5-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Trichoderma* และ *Bacillus* แต่ละชนิดสามารถลดความเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium* ลงได้ ในช่วง 95.7-97.9 เปอร์เซ็นต์ และ 53.7-96.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้ *Trichoderma* และ

Bacillus ร่วมกันในการควบคุมโรคสามารถลดความเป็นโรคของต้นกล้า ได้ในช่วง 99-99.6 เปอร์เซ็นต์ (Galina *et al.*, 1998) Soglio and kassler (1995) พบว่าประสิทธิภาพในการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับแบคทีเรีย *B. megaterium* เพื่อควบคุมโรค root rot และ seedling blight ของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของดินคือ ที่ pH ระดับ 5.5 เชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* จะส่งเสริมให้เชื้อรา *T. harzianum* สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ดีขึ้น แต่ที่ pH 7 จะไม่เกิดการส่งเสริมกันดังกล่าว แต่เมื่อใช้เชื้อรา *T. harzianum* อย่างเดียวพบว่าเชื้อ *T. harzianum* สามารถเข้าครอบครองบริเวณรอบๆ รากพืชที่ pH 7 ได้ดีกว่าที่ pH 5.5 Brewer and Larkin (2005) พบว่าการใช้เชื้อรา *T. virens* GL-21 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* GB03 สามารถควบคุมโรค stem canker ของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* ได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดอย่างเดียว คือ การใช้ *B. subtilis* GB03 อย่างเดียวลดการเกิดโรคได้ 30.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. virens* GL-21 ลดการเกิดโรคได้ 46.7 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *Fusarium* พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพียงชนิดเดียว

นอกจากนี้ยังมีการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ร่วมกันในการเพิ่มผลผลิตพืช เช่นการศึกษาของ Rudresh *et al.*, (2004) ที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับเชื้อ *Rhizobium* และร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายฟอสเฟต พบว่าทำให้ถั่ว (*Cicer aritenium* L.) มีอัตราการงอก การใช้ธาตุอาหาร ความสูงต้น จำนวนกิ่ง จำนวนปมที่ราก และปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ดังกล่าวเพียงอย่างเดียว และเมื่อตรวจนับจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งซึ่งกันและกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ใช้ในห้องปฏิบัติการ

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1. Autoclave | 11. กระดาษกรอง (Whatman No. 1) |
| 2. Petri dishes | 12. Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร |
| 3. Tubes | 13. Filter ขนาด 0.22 μ m |
| 4. Pipette/Tips | 14. Streptomycin |
| 5. Haemocytometer | 15. Rifampicin |
| 6. Depression slide | 16. Lactophenol acid fuchsin |
| 7. Centrifuge | 17. Compound microscope |
| 8. กล้องพลาสติก | 18. Shaker |
| 9. เซลโลเฟน | 19. Spectrophotometer/Cuvett |
| 10. สารเคมีควบคุมเชื้อรา mancozeb 80 WP | 20. Foggy |

ใช้ในการปลูกพริก

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. เมล็ดพริกมัน พันธุ์บางช้าง | 6. สารละลายธาตุอาหาร (ปุ๋ยน้ำ) |
| 2. ถาดเพาะเมล็ดขนาด 72 หลุม | 7. สารเคมีควบคุมแมลง |
| 3. กระถางพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว | 8. เครื่องวัด EC, เครื่องวัด pH |
| 4. จานรองกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว | 9. วัสดุปลูกไร้ดิน |
| 5. กระถางดินเผาเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 นิ้ว | 10. ฟิท |

วิธีการ

1. แยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

1.1 แยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส โดยการตัดบริเวณเป็นโรคที่ต่อกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร นำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยแช่ชิ้นพริกใน sodium hypochlorite 0.525% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษนิ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นพริกไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหาร PDA เอียง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.2 พิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) โดยการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน นำไปเตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปหยดบนผลพริกที่ปกติ ไม่แสดงอาการของโรค และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการเช็ดผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ วิธีการปลูกเชื้อมีทั้งการทำแผลด้วยเข็มเจาะเชื้อและไม่ทำแผลบนผลพริก จากนั้นนำไปบ่มเชื้อโดยวางในกล่องพลาสติกขึ้นเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบอาการโรคที่เกิดขึ้นและแยกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อโรคชนิดเดียวกัน

2. คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิบัติการควบคุมเชื้อรา

2.1 คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่างๆ จากจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ สายพันธุ์ *T. harzianum* T50 CB-Pin-01 PM9 71-42 T0.01 T152 *T. pseudokoningii* DU-07 และ *T. virens* GV โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture test โดยการย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญอยู่และตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร วางไว้ที่ขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงย้ายชิ้นวุ้นซึ่งมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญอยู่และใช้

cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ตัดมาวางตรงกันข้ามกับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวางห่างกัน 6 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดรัศมีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญออกมาจากจุดศูนย์กลาง คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากจำนวน 9 ไอโซเลท คือ *Bacillus* sp.BB165 D13 *B. cereus* B03 Ws16 *B. amyloliquefaciens* DGg13 CG30 CG06 และ *B. subtilis* CH4 CH6 โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญอยู่และตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาวางตรงจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงย้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยใช้ loopแตะเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาแตะบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไว้ก่อนแล้วโดยแตะ 4 จุด ในตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกัน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดรัศมีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญออกจากจุดศูนย์กลาง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3 คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

2.3.1 เตรียมต้นพริก

นำเมล็ดพริกมันพันธุ์บางช้างไปเพาะในกระบะเพาะกล้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.525% sodiumhypochlorite (clorox 10%) และภายในบรรจุพีทซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ รดน้ำเพื่อให้ความชื้นทุกวันและอนุบาลในสภาพโรงเรือนมุ้งตาข่ายสีขาว หลังคาพลาสติกใส คลุมด้วยตาข่ายพรางแสงสีดำ 70 เปอร์เซนต์

เมื่อต้นกล้าพริกมีอายุ 30 วัน ย้ายปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 12 นิ้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.525% sodiumhypochlorite (clorox 10%) ซึ่งบรรจุวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของกาบมะพร้าวสับ : แกลบเผา : ปุ๋ยหมัก ในอัตรา 80 : 15 : 5 โดยปริมาตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงตามความจำเป็น คือสารเคมีอะบาเม็กติน (abamectin) ในอัตรา 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง และสารเคมีอิมิดาโคลพรีด (imidacloprid) ในอัตรา 10 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว

การให้ปุ๋ย จะให้สารละลายธาตุอาหาร (ปุ๋ยน้ำ) (ภาคผนวก ข) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในอัตราต้นละ 200 มิลลิลิตรต่อกระถาง สำหรับใน 1 เดือนแรกหลังย้ายปลูก แต่หลังจากนั้นจะให้อัตราต้นละ 500 มิลลิลิตรต่อกระถาง

2.3.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากการทดลองที่ 2.2 มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนส บนผลพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งได้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท คือ *Bacillus* sp.BB165 D13 *B. amyloliquefaciens* DGg13 CG30 CG06 และ *B. subtilis* CH6

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงเชื้อใน nutrient glucose broth (NGB) นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยด้วยการเติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นที่ค่า OD. 0.2

2.3.3 เตรียมเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ด้วยการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 – 10 วัน ก่อนเติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อลงในจาน กวาดสปอร์บนผิวหน้าอาหารแล้วปรับให้มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.3.4 การทดสอบแบคทีเรียปฏิชีวนะ

ทำการทดลองโดยพ่นจุลินทรีย์ปฏิชีวนะ สารเคมี mancozeb (80 WP บริษัท ยูโนเคม จำกัด) หรือน้ำนิ่งฆ่าเชื้อผลพริกบนต้น โดยเริ่มพ่นบนผลพริกที่แก่เต็มที่มีสภาพเป็นสีเขียว

ซึ่งมีอายุของผลประมาณ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อผล และใช้ถุงพลาสติกคลุม หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง เปิดปากถุง โดยพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สัปดาห์ละครั้งทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ครั้งที่ 4 ห่างจากครั้งที่ 3 เป็นเวลา 3 วัน ทำการปลูกเชื้อโรคโดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากพ่นจุลินทรีย์ทดสอบในครั้งแรกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองโดยนำผลพริกมาประเมินความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสด้วยการวัดพื้นที่ที่เกิดโรคบนผลพริกหลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลพริกทั้งหมด 10 ผล

ตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยทำการสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร นำมาหยดบนอาหาร NGA สำหรับตรวจนับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และหยดบนอาหาร Martin's medium เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นับจำนวนโคโลนี โดยเทียบกับโคโลนีใน plate ควบคุม

ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร และนำมาตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วย haemocytometer

3. อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *T. harzianum* จากการทดลองที่ 2 คือ *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *T. harzianum* เจริญอยู่และตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร วางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยใช้ loop และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาแต่ละบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ไว้แล้ว โดยแต่ละ 4 จุด ตรงกันข้ามกันในแนวกากบาท บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน วัดขนาดรัศมีของเชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญออกจากจุดศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคัดเลือกแบคทีเรียที่มี

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* ในระดับต่ำ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. ผลของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

4.1 การทดสอบด้วยเทคนิค Dialysis membrane

การทดสอบด้วย Dialysis membrane technique เป็นการศึกษาตามวิธีการของ Gibb (1967); Whipps (1987), Simon *et. al.*, (1988) โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราที่กำลังเจริญ มาวางบนแผ่นเซลโลเฟน (นึ่งฆ่าเชื้อ) เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่วางทับอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรงกลางจาน 1 ชิ้นต่อจาน บ่มไว้ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเซลโลเฟนพร้อมทั้งเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกก่อนวางเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่อยู่บนชิ้นวุ้นขนาด 8 มิลลิเมตร ลงไปตรงกลางจาน แล้วบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ 3 และ 6 วันหลังจากวางเชื้อบนอาหาร โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb (80%WP) ผสมในอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm

4.2 ประสิทธิภาพสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

4.2.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) และสารกรอง (culture filtrate) ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสด

เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ในรูปเชื้อสด ตามวิธีการของ จิระเดช และวรรณวิไล (2545) โดยใช้ปลายข้าวหอมมะลิผสมน้ำ ในอัตราข้าว 3 ส่วน น้ำ 2 ส่วน หุงสุกในหม้อหุงข้าวไฟฟ้าอัตโนมัติ ใช้ทัพพีช้อนข้าวในหม้อที่สุกแล้วให้ทั่วตักปลายข้าวสุกขณะข้าวยังร้อน และกดข้าวให้แบนเพื่อรีดอากาศออกจากถุง ใส่ถุงพลาสติกใสชนิดร้อนขนาด 8 X 12 นิ้ว ปริมาณ 250 กรัมต่อถุง รอให้ข้าวอุ่น หรือเกือบเย็น จึงใส่หัวเชื้อรา *T. harzianum* ประมาณ 1-1.5 กรัม ขยำข้าวและหัว

เชื้อให้เข้ากันทั่วถุง รัดปากถุงด้วยยางวงหรือลวดเย็บกระดาษ ใช้เข็มสะอาดแทงรอบๆ บริเวณปากถุง 30-40 ครั้งต่อถุง บ่มเชื้อโดยการวางข้าวแช่ทั่วถุง แล้วดึงกลางถุงให้โป่งเพื่อให้อากาศเข้า วางไว้ภายใต้แสงจากหลอดไฟนีออน หรือแสงสว่างจากธรรมชาติ โดยไม่วางถุงซ้อนทับกัน เมื่อบ่มครบ 2 วัน ขย่ำข้าวในถุงเบาๆ ให้เส้นใยกระจายทั่ว แล้วบ่มเชื้อไว้ในสภาพเดิมต่ออีก 5 วัน ก่อนนำไปใช้ จะล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตรและกรองเอาเฉพาะน้ำสปอร์ เพื่อเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย

สำหรับการเตรียมสารกรอง ของเชื้อรา *T. harzianum* ได้จากการนำสปอร์แขวนลอยไปเข้าเครื่อง ultra centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที และนำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปใช้

4.2.2 ประสิทธิภาพสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

นำสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนข้าวสุก และเตรียมสารกรองตามข้อ 4.2.1 ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร หยดลงในหลุมของ depression slide หลังจากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ปริมาตรที่เท่ากันลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในกล่องพลาสติกที่ให้ความชื้นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจาก 15 ชั่วโมง นำสไลด์มาย้อมด้วย lactophenol cotton blue นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจนับสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่งอก และวัดความยาวของ germ tube โดยวัด 10 สปอร์ต่อ depression slide และทำการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum*

4.2.3 ประสิทธิภาพสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* แล้วนำชิ้นวุ้นดังกล่าวไปแช่ในสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งบรรจุอยู่ใน microtube เป็นเวลา 20 นาทีแล้วนำชิ้นวุ้นไปวางไว้บนจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยง

เชื้อที่มีอาหาร PDA และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราเทียบกับชุดควบคุมที่วางชั้นวุ้นของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งแช่ในน้ำนิ่งมาเชื้อ

5. ความสามารถของเชื้อสด *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนบนผลพริกด้วยวิธี Detached Fruit Technique

เตรียมผลพริกมัน พันธุ์บางช้างที่แก่เต็มที่ ยังเขียวสดและไม่มีอาการของโรค มาเชื้อที่บริเวณผิวผลพริกโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนผึ่งให้แห้ง ทำแผลบนผลพริกด้วยเข็มหมุดมาเชื้อตรงกลางผลจำนวน 1 แผลต่อผล โดยให้เข็มแทงทะลุผ่านผิวและเนื้อของผลพริกแต่ไม่ถึงเมล็ด จากนั้นเตรียมเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และ CB-Pin-01 ในรูปสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ตามวิธีในการทดลองที่ 4.2.1) เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ BB165 D13 และ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ DGg13 ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (เตรียมตามวิธีในการทดลองที่ 2.3.2) และเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตามวิธีในการทดลองที่ 2.3.3)

ทำการทดลองโดยหยดเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 0.025 มิลลิลิตรลงบนแผลก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงหยดสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร ลงบนแผล เชื้อทดสอบที่ใช้เป็นแบบเดี่ยว หรือใช้เชื้อทดสอบสองชนิดร่วมกัน คือ T50+BB165 T50+DGg13 T50+D13 CB-Pin-01+BB165 CB-Pin-01+DGg13 และ CB-Pin-01+D13 ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร ส่วนกรรมวิธีควบคุมคือการหยดน้ำนิ่งมาเชื้อ 0.025 มิลลิลิตร แทนเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benomyl (375 ppm) โดยทดลองเชื้อทดสอบละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลพริก 5 ผล บ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกขึ้นที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดของแผลที่เกิดเปรียบเทียบกับหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน

5.1 การตรวจปริมาณของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และเชื้อรา *T. harzianum* เมื่อใช้ร่วมกัน

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และเชื้อรา *T. harzianum* แต่ละสายพันธุ์ที่ผสมกันในรูปเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาตรวจปริมาณ โดยนำมาเกลี่ยบน

อาหาร Martin's medium ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 100 ppm เพื่อตรวจปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* และอาหาร NGA ที่เติมสารเคมี benomyl (375 ppm) เพื่อตรวจปริมาณของเชื้อ *Bacillus* spp. ภายหลังการบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว

6. ประสิทธิภาพของสารกรองในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกด้วยวิธี Detached Fruit Technique

เตรียมผลพริกมันพันธุ์บางช้างในระยะที่แก่เต็มที่และไม่มีอาการของโรค มาทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวผลพริกโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งให้แห้ง ทำแผลด้วยเข็มหมุด 1 แผลต่อผล นำไปชุบด้วยสารกรองของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิด หรือที่ผสมรวมกันใน อัตรา 1:1 บ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่ให้ความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยดทับด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีควบคุมคือการชุบผลพริกด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแทนสารกรอง โดยเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี mancozeb ในอัตรา 48 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทดสอบเชื้อละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลพริกทั้งหมด 5 ผล วัดความยาวของแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกันหลังจากปลูกเชื้อโรคแล้ว 7 วัน

7. การประยุกต์ใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

เตรียมต้นพริก เตรียมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และเชื้อสาเหตุโรค เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.3.1 2.3.2 และ 2.3.3 ตามลำดับ

7.1 การทดสอบ

พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สารเคมี mancozeb (80 WP บริษัท ยูโนเคม จำกัด) หรือน้ำนิ่งฆ่าเชื้อบนผลพริกที่มีอายุประมาณ 7 วันหลังดอกบาน อัตรา 3 มิลลิลิตร/ผล แล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง ทำการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน และพ่นสปอร์

แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์/มิลลิลิตร) ด้วยอัตรา 3 มิลลิลิตร/ผล หลังพ้น
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรรมวิธีทดสอบประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1: พ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อและเชื้อสาเหตุโรค
- กรรมวิธีที่ 2: พ่นสารเคมี mancozeb (1,920 ppm)
- กรรมวิธีที่ 3: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50
- กรรมวิธีที่ 4: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01
- กรรมวิธีที่ 5: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165
- กรรมวิธีที่ 6: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13
- กรรมวิธีที่ 7: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165
- กรรมวิธีที่ 8: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13
- กรรมวิธีที่ 9: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165
- กรรมวิธีที่ 10: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13
- กรรมวิธีที่ 11: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165
- กรรมวิธีที่ 12: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13
- กรรมวิธีที่ 13: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165
- กรรมวิธีที่ 14: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลพริกทั้งหมด 15 ผล

ประเมินความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนส โดยการวัดพื้นที่เกิดโรคบนผลพริก

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ตรวจสอบปริมาณของ
เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผลพริก โดยสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในหลอด
ทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ก่อนนำน้ำสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร
ไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวน
โคโลนีที่เกิดขึ้น

ตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* โดยสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลง
ในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ก่อนนำน้ำสปอร์ 0.1

มิลลิลิตร ไปหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ Martin's medium (Johnson and Curl, 1972) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ก่อนนำน้ำสปอร์ มาตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วย haemocytometer

8. การประยุกต์ใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)

8.1 การเตรียมต้นพริก

เตรียมต้นกล้าพริกตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.1 แต่จะย้ายต้นกล้าพริกลงปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว ลึก 15 นิ้ว ซึ่งภายในบรรจุดินผสมสำหรับการปลูกพืช และรองก้นหลุมด้วยปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 ช้อนโต๊ะต่อกระถางก่อนปลูก

พ่นสารเคมีให้กับต้นพริกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตามกรรมวิธีในการทดลองที่ 2.3.1

และให้ปุ๋ย ตามกรรมวิธีในการทดลองที่ 2.3.1 เช่นเดียวกัน

8.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

พัฒนาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. BB165 ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร NGA ซึ่งเติม rifampicin 1 ppm บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารได้ ไปเลี้ยงบนอาหาร NGA ที่มีความเข้มข้นของ rifampicin ที่สูงขึ้น คือ 5 10 20 50 และ 100 ppm ตามลำดับ โดยจะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2-3 รอบในแต่ละความเข้มข้นของ rifampicin

8.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สายพันธุ์กลาย

โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญอยู่และตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาวางตรงจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงย้ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยใช้ loop และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาเพาะบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไว้ก่อนแล้วโดยละ 4 จุด ในตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกัน บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดรัศมีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญออกจากจุดศูนย์กลาง เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สายพันธุ์ดั้งเดิม เติริมเชื้อรา *T. harzianum* ตามวิธีในการทดลองที่ 4.2.1 และเติริมเชื้อสาเหตุโรค ตามวิธีในการทดลองที่ 2.3.3

8.4 การทดลอง

พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สารเคมี หรือน้ำนิ่งฆ่าเชื้อบนผลพริกที่มีอายุประมาณ 7 วันหลังดอกบาน อัตรา 3 มิลลิตร/ผล แล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ 24 ชั่วโมง พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน และพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (10^5 สปอร์/มิลลิตร) ด้วยอัตรา 3 มิลลิตร/ผล หลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรรมวิธีทดสอบประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1: พ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2: พ่นสารเคมี mancozeb 80 WP (ที่ความเข้มข้น 1,920 ppm)

กรรมวิธีที่ 3: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50

กรรมวิธีที่ 4: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 5: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165

กรรมวิธีที่ 6: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 ผสมร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 (อัตรา 1:1 โดยปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 7: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ผสมร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 (อัตรา 1:1 โดยปริมาตร)

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completely Block Design) ตรวจสอบปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผลพริก โดยสุ่มผิวของผลพริกมา 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex ประมาณ 1 นาที ก่อนนำน้ำสปอร์ 0.1 มิลลิลิตรไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ที่เติม rifampicin 100 ppm เพื่อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อรา *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 7

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

9. การประยุกต์ใช้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย.-พ.ค. 2550)

เตรียมต้นพริกและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 8

9.1 การทดลอง

พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้กับต้นพริกที่กำลังติดผล (ผลมีอายุประมาณ 7 วันหลังดอกบาน) โดยพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ และไม่มีการพ่นเชื้อราสาเหตุโรค (*C. gloeosporioides*) เนื่องจากหลังการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 วัน พบว่าผลพริกในกรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสในระดับสูงแล้ว จึงได้ทำการเก็บผลพริกมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยมีกรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1: พ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2: พ่นสารเคมี mancozeb (1,920 ppm)

กรรมวิธีที่ 3: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50

กรรมวิธีที่ 4: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 5: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165

กรรมวิธีที่ 6: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. BB165

กรรมวิธีที่ 7: พ่นเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. BB165

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completely Block Design) ตรวจสอบปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อรา *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 7 วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($P=0.05$)

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ เรือนปลูกพืชทดลอง และแปลงปลูกพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง พฤษภาคม 2548 – มิถุนายน 2550

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการพิสูจน์โรค

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลพริกมัน พันธุ์บางช้างและพริกพันธุ์อื่นๆ โดยส่วนมากจะพบอาการของโรครุนแรงบนผลพริกที่เริ่มมีสีแดง และพบอาการของโรคน้อยบนผลพริกที่มีสีเขียวหรือยังอ่อนอยู่ ลักษณะแผลบนผลพริกเริ่มแรกเป็นแผลรูปวงรีเล็กๆ สีน้ำตาลและค่อยๆ ขยายใหญ่ขึ้น อาการบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลักษณะแผลเป็นวงกลมหรือวงรี ขอบแผลสม่ำเสมอ ขอบตัวลง เมื่อนำผลพริกที่แสดงอาการดังกล่าวมาแยกเชื้อบนอาหาร PDA ได้เชื้อราที่สร้างเส้นใยสีขาวเทา โคลนินของเชื้อราเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

จากการนำเชื้อราที่แยกได้จากพริกเป็นโรคไปปลูกเชื้อลงบนแผลพริกมันพันธุ์บางช้าง เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch' postulation พบว่าแผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 72 ชั่วโมง โดยเริ่มเห็นผิวของพริกขุดตัวเป็นจุดเล็กๆ ก่อน หลังจากนั้นบริเวณแผลเริ่มเปลี่ยนสี ขอบแผลเป็นสีน้ำตาล แผลขยายขนาดอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างสารเมือกสีส้มซึ่งภายในมีสปอร์จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วแผล และเมื่อนำผลพริกมาแยกเชื้อสาเหตุอีกครั้งบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหมือนเดิม

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี Dual culture

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* แบบ dual culture พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 55.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรองลงมาคือ *T. harzianum* T50 TO.01 71-42 และ *T. pseudokoningii* DU-07 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 51.9 51.2 48.8 และ 48.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มี

ความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับ *T. virens* GV *T. harzianum* T152 และ PM9 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 43.9 43.2 และ 38.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามหลังจากวางเชื้อรา *Trichoderma* spp. 5 วัน พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 T50 TO101 PM9 และ *T. pseudokoningii* DU-07 สามารถสร้างเส้นใยเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้หมด ในขณะที่เชื้อรา *T. harzianum* 71-42 สร้างเส้นใยคลุมทับได้เล็กน้อย ส่วนเชื้อรา *T. virens* GV และ *T. harzianum* T152 ไม่สามารถสร้างเส้นใยคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

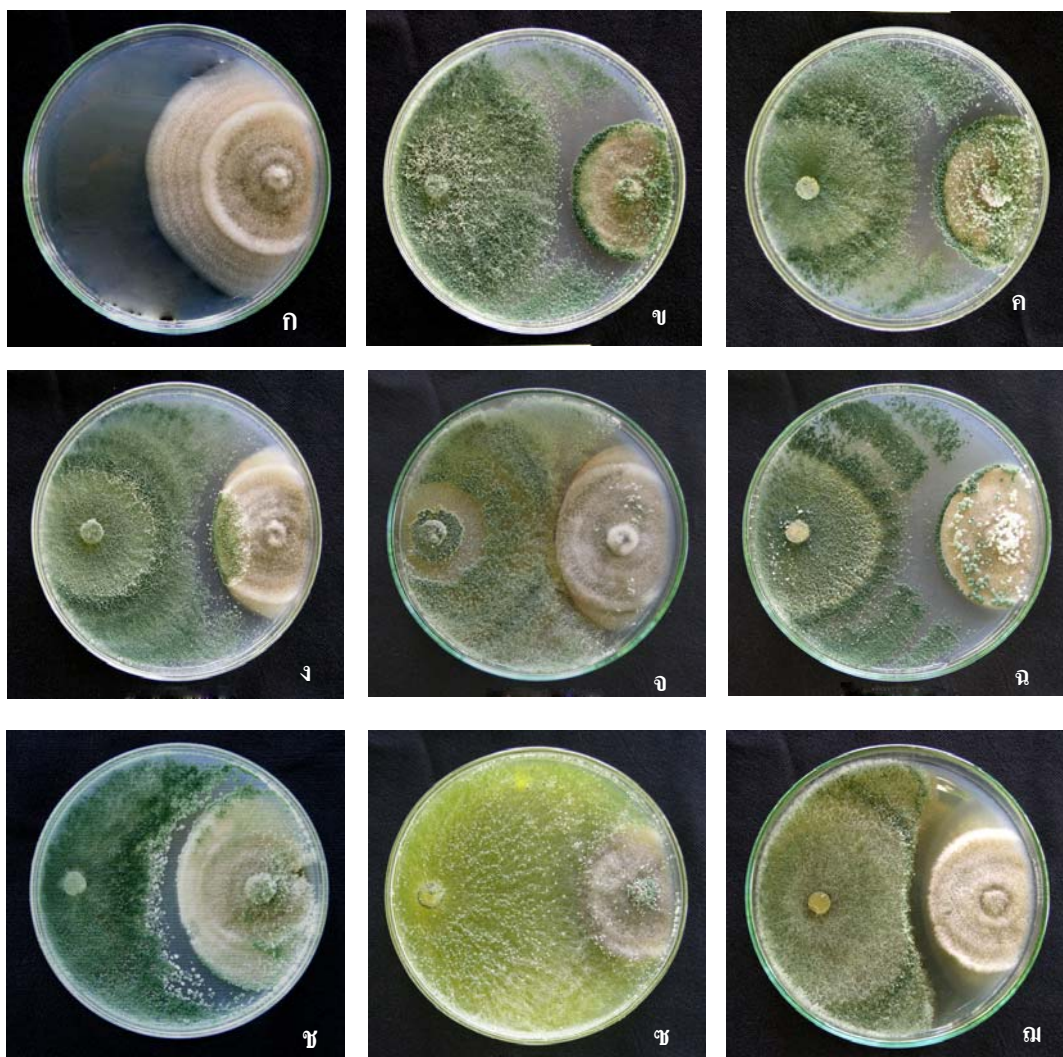
กรรมวิธีทดลอง	รัศมีเส้นใย (cm)	% การยับยั้ง ^{1/}
<i>T.harzianum</i> T50	2.0 ed ^{2/}	51.9
<i>T.harzianum</i> CB-Pin-01	1.8 e	55.4
<i>T.harzianum</i> T152	2.3 c	43.2
<i>T. harzianum</i> T0.01	2.0 d	51.2
<i>T. harzianum</i> 71-42	2.1 d	48.8
<i>T. harzianum</i> PM9	2.5 b	38.3
<i>T. pseudokoningii</i> DU-07	2.1 d	48.0
<i>T. virens</i> GV	2.3 c	43.9
<i>C. gloeosporioides</i> (control)	4.1 a	-

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$

R1= ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานควบคุม

R2= ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์
หลังหยุดการเจริญ

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



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

ก. <i>C. gloeosporioides</i> (control)	ฉ. <i>T. harzianum</i> T0.01
ข. <i>T. harzianum</i> T50	ช. <i>T. harzianum</i> PM9
ค. <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	ซ. <i>T. pseudokoningii</i> DU-07
ง. <i>T. harzianum</i> 71-42	ณ. <i>T. virens</i> GV
จ. <i>T. harzianum</i> T152	

2.2 ประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

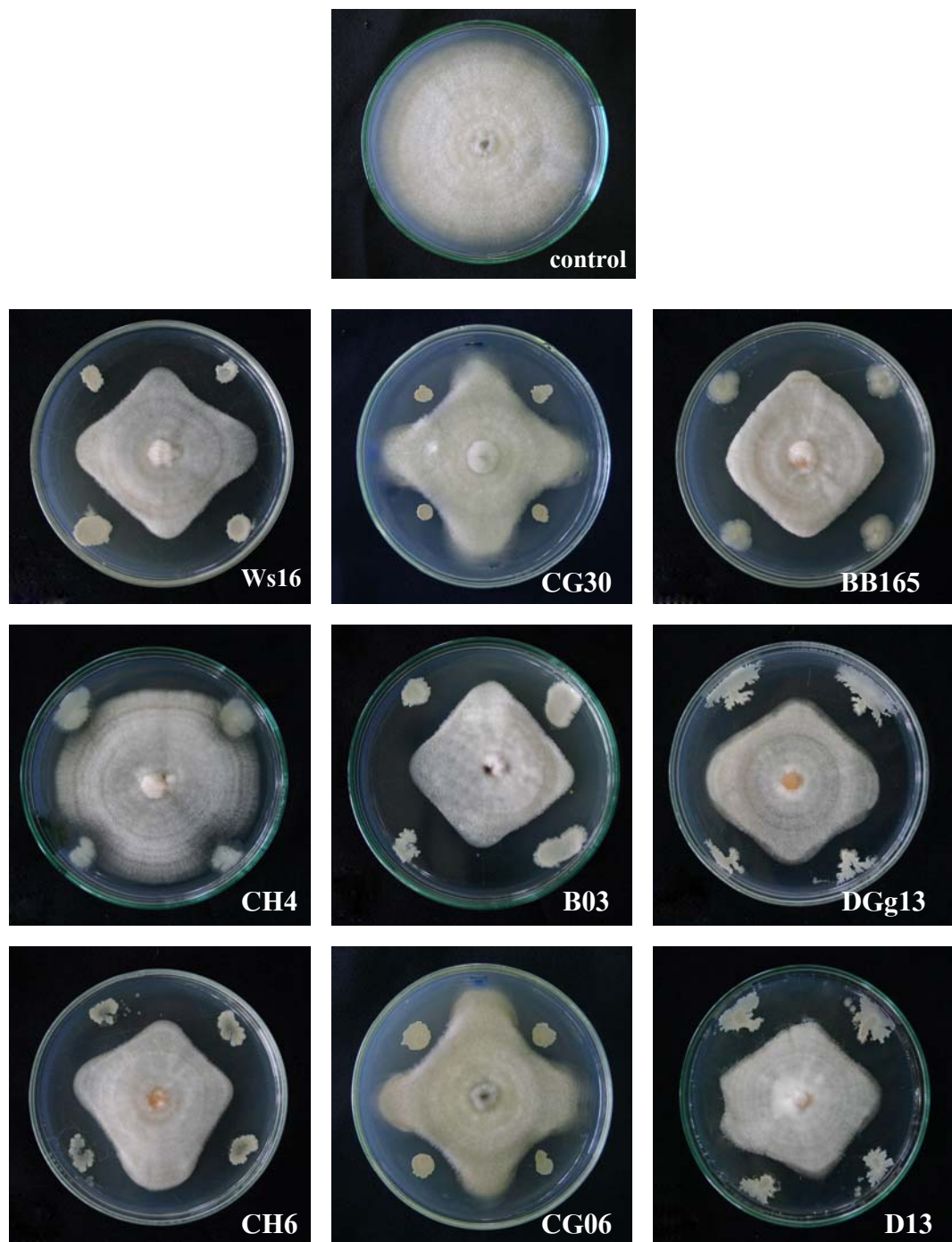
เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 39.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG30 และ CG06 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 38.85 เปอร์เซ็นต์ และที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* CH6 *B. cereus* B03 *Bacillus* sp. D13 และ *B. amyloliquefaciens* DGg-13 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 37.5 37.0 35.4 และ 33.6 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* CH4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุดคือ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธีทดลอง	รัศมีเส้นใย (cm)	% การยับยั้ง ^{1/}
<i>Bacillus</i> sp. BB165	2.3 e ^{2/}	39.6
<i>Bacillus</i> sp. D13	2.5 c-e	35.4
<i>B. cereus</i> B03	2.4 de	37.0
<i>B. cereus</i> Ws16	2.5 c	33.6
<i>B. subtilis</i> CH6	2.4 de	37.5
<i>B. subtilis</i> CH4	3.5 b	8.7
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGg13	2.5 cd	34.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG30	2.3 e	38.8
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG06	2.3 e	38.8
<i>C. gloeosporioides</i> (control)	3.8 a	-

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* กำหนดจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร

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



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

3. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ แต่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพียง 19.8 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGg13 *B. subtilis* CH6 *B. amyloliquefaciens* CG30 CG06 และ *Bacillus* sp.D13 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 25.0 28.8 25.8 24.9 และ 25.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 68.6 63.8 67.6 68.7 และ 67.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ที่ได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคด้วย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้น้อยกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกชนิด คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 59.2 และ 51.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การสุ่มตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผลพริกทุกกรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คืออยู่ในช่วง $1.0\text{--}2.0 \times 10^2$ CFU/cm² สำหรับปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ตรวจนับได้จากผลพริก พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *T. harzianum* มีปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* น้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม คือจะพบประมาณ $1\text{--}5 \times 10^2$ สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* 7.9×10^5 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผล
พริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน

กรรมวิธีทดลอง	พื้นที่ผิวพริก ที่เป็นโรค (%)	การยับยั้ง (%) ^{1/}	ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. (10 ² CFU/cm ²) ^{2/}	ปริมาณเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> (10 ⁴ spores/cm ²) ^{3/}
<i>Bacillus</i> sp.BB165	19.8 e ^{4/}	75.2	2.0	1.5
<i>Bacillus</i> sp. D13	25.7 d	67.8	1.9	1.7
<i>B. subtilis</i> , CH6	28.8 cd	63.8	1.6	5.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGg-13	25.0 d	68.6	1.7	1.7
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG30	25.8 d	67.6	1.6	5.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG06	24.9 d	68.7	1.7	1.7
<i>T. harzianum</i> T50	38.9 b	51.1	1.0	5.5
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	32.5 c	59.2	1.2	2.7
สารเคมี mancozeb(1,920 ppm)	0.0 f	100.0	-	-
กรรมวิธีควบคุม (น้ำเปล่า)	79.7 a	-	-	78.5

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ
เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับพื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม ตามสูตร
 $\frac{C-T}{C} \times 100$ C= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม
T= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ

^{2/} ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนผิวพริกที่
ตรวจนับด้วยวิธี serial dilutions โดยใช้อาหาร NGA และ Martin's medium

^{3/} ปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ตรวจนับด้วย haemocytometer

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



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกคโนสบนผลพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน

4. ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

4.1 การทดสอบด้วยเทคนิค Dialysis membrane

เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 สามารถสร้างสารทุติยภูมิซึมผ่านเซลโลเฟนลงไปในตะกอนอาหาร PDA ได้ ช่วยให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* 67.9 และ 65.6 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 หลังการทดสอบ และในวันที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 40.76 และ 39.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จากการทดสอบด้วยเทคนิค Dialysis membrane บนอาหาร PDA

กรรมวิธีทดลอง	รัศมีโคโลนีของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> (cm)		การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> (%) ^{1/}	
	3 วัน	6 วัน	3 วัน	6 วัน
<i>T. harzianum</i> T50	0.4 b ^{2/}	1.9 b	65.6	39.5
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	0.4 b	1.9 b	67.9	40.8
สารเคมี mancozeb	0.3 b	0.6 c	77.1	80.9
<i>C. gloeosporioides</i> (control)	1.3 a	3.1 a	-	-

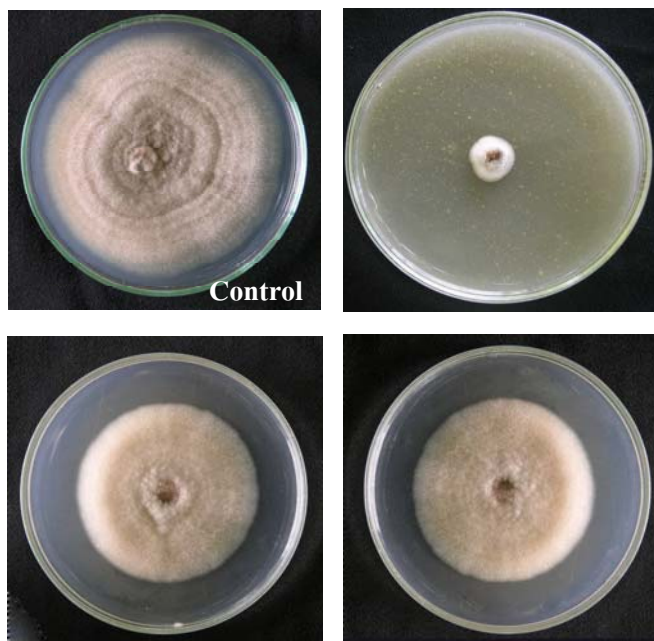
หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในงานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$

R1

R1= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชในงานควบคุม

R2= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

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



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Dialysis membrane หลังปลูกเชื้อโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

4.2 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ คือ วัดรัศมีโคโลนีเชื้อโรคจากกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ได้ 0.9 และ 0.9 mm เมื่อครบ 3 วัน หลังจากวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (ใช้น้ำนิ่งมาเชื้อแทนสารกรอง) วัดรัศมีโคโลนีของเชื้อโรคได้ 2.0 mm และเมื่อปล่อยให้เชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญต่อจนครบ 6 วัน พบว่ารัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ยังคงมีขนาดที่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม คือ 2.9 และ 2.9 mm ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีรัศมีโคโลนีเท่ากับ 2.9 mm

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อ *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA

กรรมวิธีทดลอง	รัศมีโคโลนีของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> (cm)		การยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> (%) ^{1/}	
	3 วัน	6 วัน	3 วัน	6 วัน
<i>T. harzianum</i> T50	0.9 a ^{2/}	2.9 a	2.1	0.0
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	2.0 a	2.9 a	1.0	1.1
สารเคมี mancozeb	0.3 b	0.6 b	70.8	79.9
<i>C. gloeosporioides</i> (control)	2.0 a	2.9 a	-	-

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในงานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$

R1

R1= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชในงานควบคุม

R2= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

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

4.3 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการยับยั้งสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ที่ได้จากการเลี้ยงบนเมล็ดข้าวช่วยให้สปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* งอกและสร้าง germ tube ได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม คือสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* 97.4% และมีความยาวของ germ tube 7.3 μm ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* T50 คือมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 96.4% และ germ tube มีความยาว 7.2 μm ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมซึ่งใช้น้ำนิ่งมาเชื้อแทนสารกรองทำให้สปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* มี

เปอร์เซ็นต์การงอก 82.5 เปอร์เซ็นต์ และ germ tube มีความยาว 2.1 μm สำหรับสารกรองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีผลการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และความยาวของ germ tube ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม คือ มีเปอร์เซ็นต์การงอก 83.3 เปอร์เซ็นต์ และ germ tube ยาว 2.2 μm ส่วนสารเคมี mancozeb สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของสารพิษภูมิในสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวต่อการยับยั้งสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

กรรมวิธีทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i>	ความยาว germ tube ของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> (μm)
<i>T. harzianum</i> T50	96.4 a ^{1/}	7.2 a ^{1/}
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	97.4 a	7.3 a
<i>Bacillus</i> sp. BB165	83.3 b	2.2 b
สารเคมี mancozeb	0.0 c	0.0 c
กรรมวิธีควบคุม (น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ)	82.5 b	2.1 b

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

5. การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองชนิด โดยรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *T. harzianum* ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมคือ 4.5 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06 และ CG30 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *T. harzianum* มากที่สุด คือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 46 และ 44.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* T50 53.3 และ 51.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือแบคทีเรีย *B. subtilis* CH6 และ *Bacillus* sp. BB165 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 34.9

และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* T50 32.7 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGg-13 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *T. harzianum* น้อยที่สุดคือ 18.9 เปอร์เซ็นต์ ในเชื้อรา *T. harzianum* T50 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ในเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture บนอาหารPDA หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน

เชื้อรา <i>T. harzianum</i> เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.	CB-Pin-01		T50	
	รัศมีโคโลนี	การยับยั้ง (%) ^{1/}	รัศมีโคโลนี	การยับยั้ง (%)
<i>Bacillus</i> sp. BB165	3.0 c ^{2/}	33.3	2.9 c	36.0
<i>Bacillus</i> sp. D13	4.5 a	00.0	4.5 a	00.0
<i>B. subtilis</i> CH6	2.9 c	34.9	3.0 c	32.7
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGg-13	3.6 b	18.9	3.3 b	26.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG30	2.5 d	44.4	2.2 d	51.1
<i>B. amyloliquefaciens</i> CG06	2.4 d	46.0	2.1 d	53.3
control	4.5 a	-	4.5 a	-

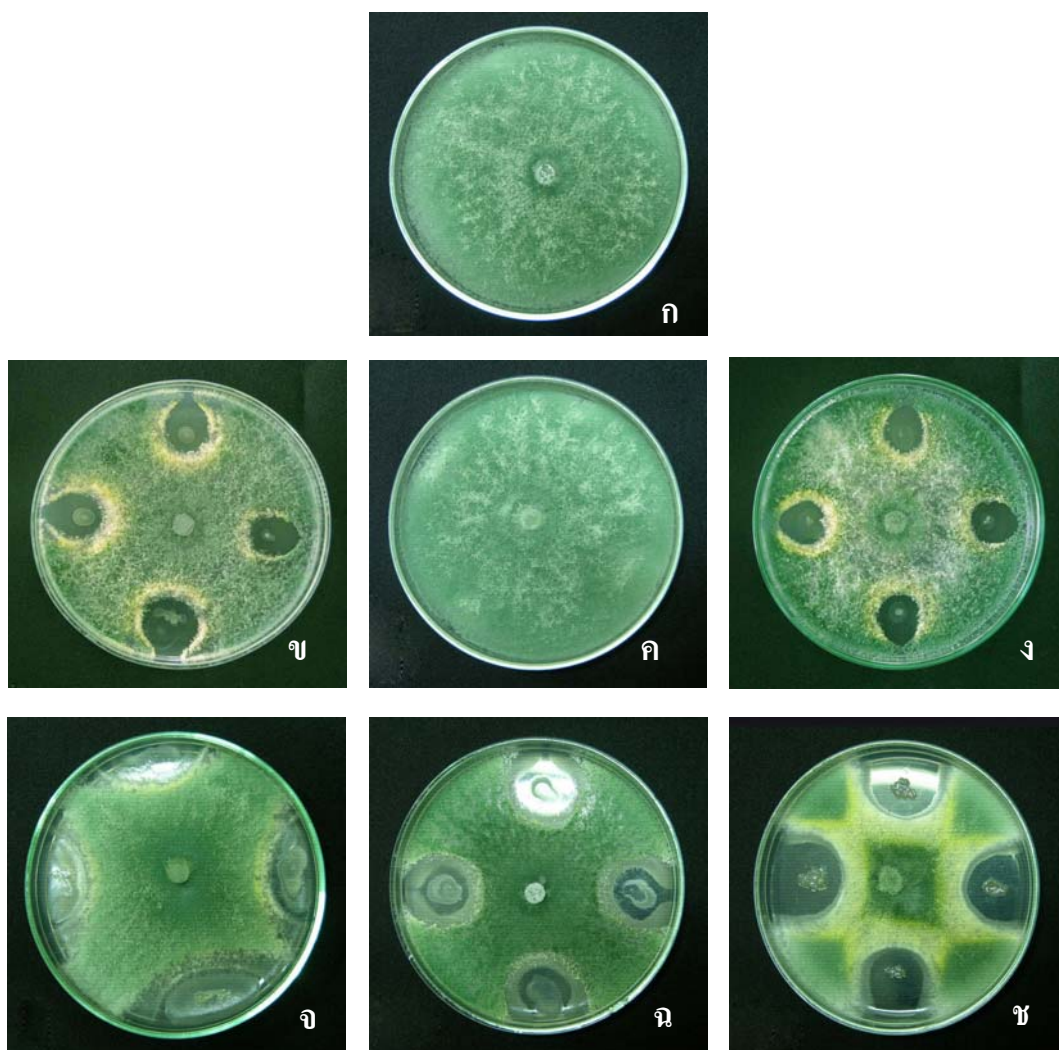
หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในจานควบคุม ตามสูตร $\frac{R1-R2}{R1} \times 100$

R1

R1= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชในจานควบคุม

R2= รัศมีโคโลนี ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธีการทดสอบแบบ Dual culture บนอาหาร PDA หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน

ก. *T. harzianum* (control)

ข. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG06

ค. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13

ง. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165

จ. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGg13

ฉ. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* CH6

ช. *T. harzianum* ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CG30

6. ความสามารถของเชื้อสด *Trichoderma harzianum* และ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริกด้วยวิธี Detached Fruit Technique

กรรมวิธีที่ใช้เซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ดีที่สุด คือ 90.8 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแผลบนผลพริกเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร และมีขนาดของแผลไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และ CB-Pin-01 ซึ่งมีขนาดแผล 1.0 และ 1.0 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันก็ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี benomyl ซึ่งมีขนาดแผลบนผลพริกเฉลี่ย 1.5 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ทั้งสองกรรมวิธียังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมากกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สามารถลดขนาดของแผลบนผลพริกดีกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 และมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ *B. amyloliquefaciens* DGg13 สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า เชื้อรา *T. harzianum* T50 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลดลง คือ 64.7 และ 66.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGg13 มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ *T. harzianum* CB-Pin-01 แต่ลดลงเมื่อใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 คือ 72.6 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 มีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 แบบเดี่ยว

สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* T50 และ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGg13 แต่มีประสิทธิผลลดลงเมื่อใช้ร่วมกับ *Bacillus* sp. BB165 และ D13 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยวิธี Detached fruit Technique หลังจากปลูกเชื้อโรค 7 วัน

กรรมวิธีทดลอง	ความยาวแผล (cm) ^{1/}	การยับยั้งการเกิดโรค (%) ^{2/}
<i>Bacillus</i> sp. BB165	0.3 d ^{3/}	90.8
<i>Bacillus</i> sp. D13	1.5 b	50.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGg13	0.6 b-d	79.2
<i>T. harzianum</i> T50	1.0 b-d	67.0
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	0.5 b-d	81.8
T50 + BB165	1.1 b-d	64.7
T50 + D13	1.2 b-d	60.4
T50 + DGg-13	0.8 b-d	72.6
CB-Pin-01 + BB165	1.0 b-d	66.3
CB-Pin-01 + D13	0.6 b-d	80.2
CB-Pin-01 + DGg-13	0.4 cd	87.5
benomyl (375 ppm)	1.3 bc	57.8
Control	3.0 a	-

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยความยาวแผลบนผลพริกหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 7 วัน

^{2/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค คำนวณจากความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกในกรรมวิธีทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกในกรรมวิธีควบคุมตามสูตร $\frac{C-T}{C} \times 100$

C

C= ความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกในกรรมวิธีควบคุม

T= ความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกในกรรมวิธีทดสอบ

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

6.1 ปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* T50 และ CB-Pin-01 ในกรรมวิธีที่ใช้ร่วมกับ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 0-4 ชั่วโมง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่บ่มเชื้อ 4-8 ชั่วโมง ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งมีปริมาณ *T. harzianum* T50 ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติในระยะเวลาการบ่มเชื้อ 0 4 และ 8 ชั่วโมง คือมีปริมาณ $3.5 \ 3.4$ และ 2.8×10^8 CFU/ml ตามลำดับ

สำหรับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 และ *B. amyloliquefaciens* DGg13 ที่ใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ มีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 0-4 ชั่วโมง แต่จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 8 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 *Bacillus* sp.D13 และ *B. amyloliquefaciens* DGg13 แบบเดี่ยว ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ร่วมกับ เชื้อรา *T. harzianum* T50 และ CB-Pin-01 พบว่าปริมาณของ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ 0 4 และ 8 ชั่วโมง แต่ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ในกรรมวิธีที่ใช้แบบเดี่ยว

ตารางที่ 9 ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. หลังจากผสมกันในรูปของสปอร์และเซลล์แขวนลอยที่ระยะเวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง

Treatment	<i>T. harzianum</i> (x10 ⁸ CFU/ml)			<i>Bacillus</i> sp. (x10 ⁸ CFU/ml)		
	0 hr	4 hr	8 hr	0 hr	4 hr	8 hr
<i>T. harzianum</i> T50	6.2 a ^{1/}	4.9 ab	3.4 b	-	-	-
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	5.7 a	4.8 ab	3.1 b	-	-	-
T50+165	3.7 a	2.8 b	2.3 b	3.0 a	2.7 a	0.3 b
T50+DGg-13	3.0 a	2.9 a	2.3 b	3.3 a	3.1 a	0.3 b
T50+D13	3.5 a	3.4 a	2.8 a	3.5 a	2.8 b	0.5 c
CB-Pin-01+165	3.3 a	3.1 a	2.4 b	3.4 a	3.1 a	0.6 b
CB-Pin-01+DGg-13	3.5 a	2.9 ab	2.3 b	3.2 a	3.0 a	0.5 b
CB-Pin-01+D13	3.6 a	3.0 ab	2.1 b	2.9 a	2.5 ab	0.5 c
<i>Bacillus</i> sp. 165	-	-	-	5.6 a	5.4 a	4.0 b
<i>Bacillus</i> sp.DGg13	-	-	-	5.5 a	4.6 ab	4.1 b
<i>Bacillus</i> sp. D13	-	-	-	5.4 a	5.0 ab	4.2 b

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

7. ประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธี **Detached Fruit technique**

สารกรองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น (100 เปอร์เซ็นต์) และที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกือบทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายผลพริกของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ในระดับที่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี benomyl และ mancozeb ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยของขนาดแผลบนผลพริก 1.1 และ 1.0 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด คือ 75.9 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแผล 0.6 เซนติเมตร ในขณะที่สารกรองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 และ *B. amyloliquefaciens* DGg13 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 32.3 และ 17.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* T50 และ CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 31.6 และ 36.8 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแผลบนผลพริกไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 1.8 และ 1.7 เซนติเมตร ตามลำดับ

ในกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 *B. amyloliquefaciens* DGg13 หรือ *Bacillus* sp. BB165 พบว่าทุกกรรมวิธีมีขนาดแผลบนผลพริกไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 1.4 - 2.2 เซนติเมตร

สำหรับประสิทธิภาพของสารกรองที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกกรรมวิธีมีขนาดแผลบนผลพริกมากกว่าการใช้สารกรองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลง แต่อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีก็มียประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมี mancozeb หรือ benomyl ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับสารกรองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งมีขนาดแผลบนผลพริกไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม คือมีขนาดแผล 2.4 เซนติเมตร (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธี Detached Fruit Technique หลังจากปลูกเชื้อโรค 7 วัน

กรรมวิธีทดลอง	ความเข้มข้นของสารกรอง เริ่มต้น		ความเข้มข้นของสารกรอง เจือจาง 10%	
	ความยาวแผล	การยับยั้ง	ความยาวแผล	การยับยั้ง
	(cm) ^{1/}	(%) ^{2/}	(cm)	(%)
<i>T. harzianum</i> T50	1.8 ab ^{3/}	31.6	1.8 ab	31.6
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	1.7 a-c	36.8	1.8 ab	30.8
<i>Bacillus</i> sp. BB165	0.6 c	75.9	1.6 ab	41.3
<i>Bacillus</i> sp. D13	2.0 ab	32.3	2.3 ab	15.4
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGg-13	2.2 ab	17.3	1.1 b	58.6
T50+BB165	1.4 bc	46.6	1.6 ab	41.3
T50+D13	2.0 ab	24.8	2.4 a	8.3
T50+DGg-13	1.7 a-c	30.8	2.3 ab	15.0
CB-Pin-01+BB165	2.2 ab	18.8	2.2 ab	15.8
CB-Pin-01+D13	1.6 a-c	39.8	1.8 ab	32.3
CB-Pin-01+DGg13	1.7 a-c	34.6	1.8 ab	33.1
สารเคมี mancozeb(1,920 ppm)	1.0 bc	60.9	1.0 b	60.9
สารเคมี benomyl (375 ppm)	1.1 bc	58.6	1.1 b	58.6
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	2.7 a	-	2.7 a	-

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยของความยาวแผล (cm) บนผลพริกหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 7 วัน

^{2/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งโรคบนผลพริกสาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* คำนวณจากความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับความยาวแผลเฉลี่ยบนผลพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม

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

8. การประยุกต์ใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 หรือ *Bacillus* sp. D13 แบบเดี่ยวจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยว โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 และ *Bacillus* sp. D13 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 0.5 และ 5.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 97.0 และ 69.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 แบบเดี่ยวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 6.6 และ 7.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 61.0 และ 58.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกันหรือสลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าไม่ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคที่สูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว แต่จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยว อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 หรือที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สลับกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 2.2 2.9 2.9 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 หรือที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 สลับกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 6.7 9.2 3.9 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สุ่มตรวจได้จากผลพริกในทุกกรรมวิธีมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ $0.7-2.1 \times 10^3$ CFU/cm² สำหรับปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* ที่ตรวจพบคือ $0.8-2.6 \times 10^2$ CFU/cm² ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้ *T. harzianum* T50 ร่วมกับ *Bacillus* sp. D13 และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งมีปริมาณ 28 และ 19 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ

การตรวจนับปริมาณเชื้อรา *C.gloeosporioides* พบว่าส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค คือจะมีปริมาณเชื้อรา *C.gloeosporioides* มากในกรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงและมีปริมาณ *C. gloeosporioides* น้อยในกรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำ เช่น กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 กรรมวิธีที่ใช้ *T. harzianum* CB-Pin-01 สลับกับเชื้อ *Bacillus* sp. BB165 กรรมวิธีที่ใช้ *T. harzianum* T50 สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 กรรมวิธีที่ใช้ *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับ *Bacillus* sp. BB165 *T. harzianum* T50 ร่วมกับ *Bacillus* sp. BB165 และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ *Bacillus* sp. D13 แบบเดี่ยว ซึ่งมีปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ใช้ร่วมกันหรือสลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน

กรรมวิธีทดลอง	พื้นที่ผิวพริก ที่เป็นโรค %	การยับยั้ง % ^{1/}	ปริมาณ <i>Bacillus</i> sp. (10 ³ CFU/cm ²)	ปริมาณ <i>Trichoderma</i> (10 ³ CFU/cm ²)	ปริมาณเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> (10 ² CFU/cm ²)
T50	7.0 bc ^{2/}	58.7	-	2.1	10 cd
CB-Pin-01	6.6 bc	61.0	-	2.6	5 de
<i>Bacillus</i> sp.BB 165	0.5 d	97.0	1.8	-	0 e
<i>Bacillus</i> sp. D13	5.2 b-d	69.1	1.7	-	6 de
T50 + BB165	2.2 cd	87.0	0.9	1.1	2 de
T50 + D13	6.7 bc	60.7	0.7	0.8	15 c
CB-Pin-01+ BB165	2.9 cd	83.1	1.0	1.3	2 de
CB-Pin-01+ D13	9.2 b	45.8	0.9	1.1	9 c-e
T50 /BB165	2.9 cd	83.1	2.1	2.4	24 b
T50 / D13	3.9 cd	77.3	1.5	2.0	1 e
CB-Pin-01/ BB165	1.1 d	93.6	2.1	2.5	0 e
CB-Pin-01 / D13	6.5 bc	61.7	1.8	2.3	8 c-e
สารเคมี mancozeb	0.0 d	100	-	-	0 e
กรรมวิธีควบคุม	17.0 a	-	-	-	41 a

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับพื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม

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



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เมื่อใช้ร่วมหรือสลับกันในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของ *Trichoderma harzianum* และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เมื่อใช้ร่วมหรือสลับกันในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน (ต่อ)

หมายเหตุ CB-Pin-01 = ฟันเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01
 T50 = ฟันเชื้อรา *T. harzianum* T50
 BB165 = ฟันเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.BB165
 D13 = ฟันเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.D13
 T50+BB165 = ฟัน *T. harzianum*T50 ร่วมกับ *Bacillus* sp.BB165 (อัตรา 1:1 โดยปริมาตร)
 T50 + D13 = ฟัน *T. harzianum*T50 ร่วมกับ *Bacillus* sp.D13 (อัตรา 1:1 โดยปริมาตร)
 CB-Pin-01 สลับ BB165 = ฟัน *T.harzianum* CB-Pin-01 สลับกับ *Bacillus* sp.BB165
 CB-Pin-01 สลับ D13 = ฟัน *T.harzianum* CB-Pin-01 สลับกับ *Bacillus* sp.D13

9. การประยุกต์ใช้เชื้อเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)

ได้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 100 ppm (BB165-M) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ไม่แตกต่างจากของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 สายพันธุ์ดั้งเดิม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 พบว่าทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคสูงที่สุดคือ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 14.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค 59.6 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 และ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 14.7 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค 57.5 และ 56.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทั้ง 3 กรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยวทั้งสายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากกว่าการใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 17.4 และ 23.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรค 49.7 และ 31.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

จากการตรวจปริมาณจุลินทรีย์บนผิวพริก พบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M 1.9×10^3 CFU/cm² ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 แบบเดี่ยว ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ตรวจพบ 8.2 และ 1.0×10^3 CFU/cm² ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยว ในขณะเดียวกันปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 ที่ใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ก็มีเชื้อปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือมี 1.5 และ 2.1×10^2 CFU/cm² ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 แบบเดี่ยวซึ่งมีปริมาณ 4.2 และ 6.1×10^2 CFU/cm² ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

สำหรับปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ตรวจพบในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มี $0.8-2.1 \times 10^4$ spores/cm² ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมี 3.5×10^5 spores/cm² (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกจากการทดสอบในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)

กรรมวิธีทดลอง	% การเกิดโรค	% การยับยั้ง ^{1/}
<i>T. harzianum</i> T50	23.7 b ^{2/}	31.4
<i>T. harzianum</i> CB-Pin-01	17.4 b	49.7
<i>Bacillus</i> sp. BB165-M ^{3/}	14.0 c	59.6
T50+ BB165-M	14.7 c	57.5
CB-Pin-01+ BB165-M	15.0 c	56.7
สารเคมี mancozeb (1,920 ppm)	0.3 d	99.2
กรรมวิธีควบคุม	34.6 a	-

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับพื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม

ตามสูตร $\frac{C-T}{C} \times 100$

C

C= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม

T= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ

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

^{3/} สายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M สายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M

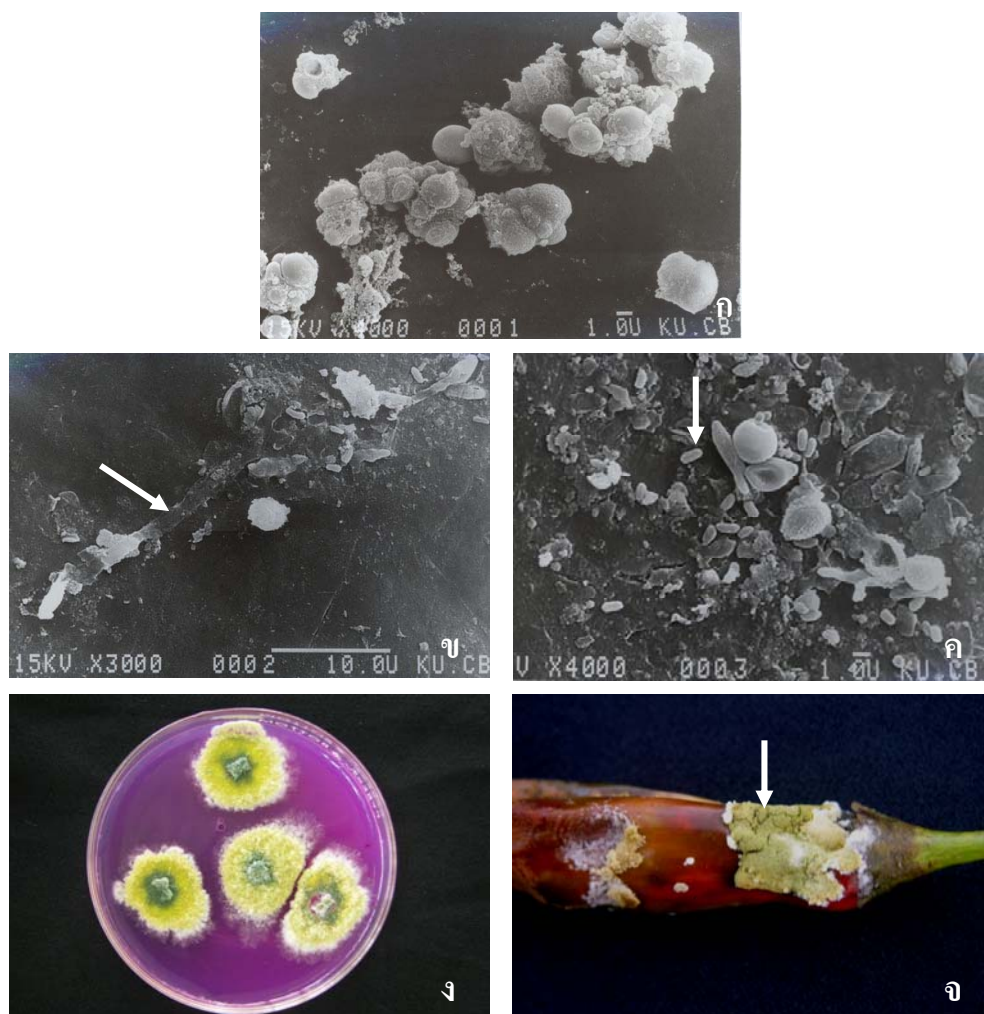


ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกจากการทดสอบในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550) หลังปลูกเชื้อโรค 20 วัน

ตารางที่ 13 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M และเชื้อสาเหตุโรคนบนผลพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)

กรรมวิธีทดลอง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค		
	<i>Bacillus</i> sp.BB165 (10 ³ CFU/cm ²)	<i>T. harzianum</i> (10 ² CFU/cm ²)	<i>C. gloeosporioides</i> (10 ³ spores/cm ²)
<i>T.harzianum</i> T50	-	4.3 a ^{1/}	0.9 b
<i>T.harzianum</i> CB-Pin-01	-	6.1 a	0.8 b
<i>Bacillus</i> sp.BB165-M	1.9 a	-	2.1 b
T50+ BB165-M	0.8 b	1.5 b	2.0 b
CB-Pin-01+ BB165-M	1.0 b	2.1 b	1.0 b
สารเคมี mancozeb (1,920 ppm)	-	-	1.0 b
กรรมวิธีควบคุม	-	-	35.0 a

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)



ภาพที่ 8 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ปรากฏบนผลพริก จากการทดสอบในสภาพแปลงครั้งที่ 1 (มี.ค. – เม.ย. 2550)

ก. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงกลุ่มสปอร์เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ข. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ค. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. BB165-M บนผิวของผลพริก

ง. เชื้อรา *T. harzianum* บนผิวพริกเจริญออกมารอบๆ ขึ้นส่วนผิวของผลพริกบนอาหาร Martin's medium

จ. เชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญคลุมทับบริเวณแผลเน่าแตรคโนสบนผิวของผลพริก

10. การประยุกต์ใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย. – พ.ค. 2550)

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 พบว่าทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริก โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสได้ในระดับที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค 79.3 69.3 79.1 และ 66.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารเคมี mancozeb มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรค 82.1 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M อย่างเดียวพบว่ามีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M 2.6×10^3 CFU/cm² และในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 หรือ T50 มีปริมาณแบคทีเรีย 1.0×10^3 และ 0.7×10^3 CFU/cm² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 อย่างเดียวมีความเข้มข้นของเชื้อบนผลพริก 9.1×10^2 CFU/cm² ในขณะที่ใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M มีความเข้มข้น 3.8×10^2 CFU/cm² สำหรับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* sp. CB-Pin-01 ในกรรมวิธีที่ใช้แบบเดียวมีความเข้มข้น 7.2×10^2 CFU/cm² และในกรรมวิธีที่ใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M มีความเข้มข้นเชื้อรา 3.0×10^2 CFU/cm²

ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในกรรมวิธีควบคุม 3.0×10^5 spores/cm² สำหรับในกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธีมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 หรือ CB-Pin-01 กรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M และ กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M มีความเข้มข้นเชื้อรา *C. gloeosporioides* 5.8 6.8 5.9 6.0 และ 6.6×10^4 spores/cm² ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย. – พ.ค. 2550)

กรรมวิธีทดลอง	% การเกิดโรค	% การยับยั้ง ^{1/}
<i>T.harzianum</i> T50	14.8 b ^{2/}	58.1
<i>T.harzianum</i> CB-Pin-01	10.9 bc	69.3
<i>Bacillus</i> sp. BB165-M ^{3/}	7.3 c	79.3
T50 + BB165-M	7.4 c	79.1
CB-Pin-01+ BB165-M	11.7 bc	66.9
สารเคมี mancozeb (1,920 ppm)	6.3 c	82.1
กรรมวิธีควบคุม	35.4 a	-

หมายเหตุ ^{1/} เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* คำนวณจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับพื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม ตามสูตร $\frac{C-T}{C} \times 100$

C

C= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีควบคุม

T= เปอร์เซ็นต์พื้นที่ผิวพริกที่เป็นโรคในกรรมวิธีทดสอบ

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

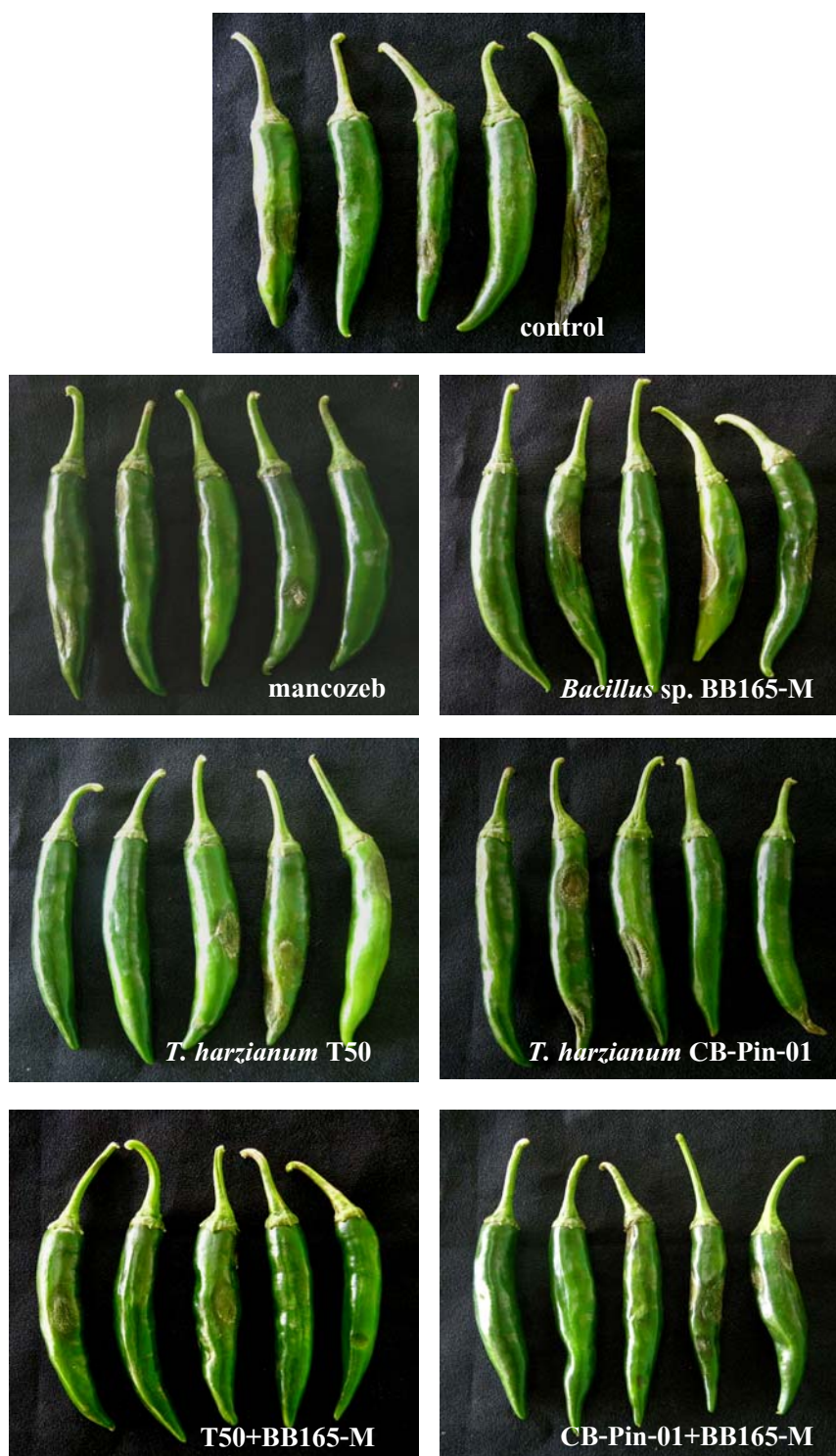
^{3/} สายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M

ตารางที่ 15 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BB165-M และเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย. – พ.ค. 2550)

กรรมวิธีทดลอง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค		
	<i>Bacillus</i> sp.BB165-M (10 ³ CFU/cm ²)	<i>T. harzianum</i> (10 ² CFU/cm ²)	<i>C. gloeosporioides</i> (10 ⁴ spores/cm ²)
<i>T.harzianum</i> T50	-	9.1 a ^{1/}	5.8 b ^{1/}
<i>T.harzianum</i> CB-Pin-01	-	7.2 a	6.8 b
<i>Bacillus</i> sp. BB165-M ^{2/}	2.6 a	-	5.9 b
T50 + BB165-M	0.7 b	3.8 b	6.0 b
CB-Pin-01 + BB165-M	1.0 b	3.0 b	6.6 b
สารเคมี mancozeb	-	-	2.9 b
กรรมวิธีควบคุม	-	-	30.2 a

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's multiple range test (P=0.05)

^{2/} สายพันธุ์กลายของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165-M



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BB165-M ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงครั้งที่ 2 (เม.ย. – พ.ค. 2550)

วิจารณ์

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกที่แสดงอาการของโรค มีลักษณะทั่วไปตรงกับที่ศักดิ์ (2537), สมศิริ (2521) และ ศศิธร (2545) ได้เคยรายงานไว้ โดยอาการบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* แผลจะเป็นรูปยาวรี ขอบตัว บริเวณแผลมีสีเหลืองเข้ม

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดเพราะนอกจากมีการสร้างสารออกมายับยั้งทำให้เกิด clear zone แล้วเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ยังมีการเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์ได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ชนิดอื่นๆ โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ซึ่งตรงกับคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดย จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช 3 แบบคือ กระบวนการแข่งขัน จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคของพืชในด้านต่าง ๆ เช่นการแย่งใช้ธาตุอาหาร อากาศ การครอบครองพื้นที่ที่ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญในบริเวณที่มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ กระบวนการปรสิต เป็นการที่จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตได้รับประโยชน์จากเชื้อโรคในรูปของสารอาหาร และทำให้เชื้อโรคนั้นถูกทำลายในที่สุด (จิระเดช, 2549) และการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ไปฆ่าจุลินทรีย์เป้าหมาย สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (Frevel, 1977) ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางชนิด เช่น *T. virens* GV ไม่สามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ หรือเชื้อรา *T. pseudokoningii* DU-07 เจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ แต่มีการสร้างสปอร์ได้น้อยและไม่มี clear zone

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจากทั้งหมด 9 ชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 8 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* CH4 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพียง 8.66 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 8 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีการสร้างสารปฏิชีวนะสารออกมายับยั้งทำให้เกิด clear zone มีผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเจริญได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญได้ (Whipps, 1987) และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Kupper *et al.*, (2003) ที่ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรค postbloom fruit drop ของส้ม และพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 16 ไอโซเลทสามารถสร้างสาร metabolite มายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture นอกจากนี้ Kelemu and Badol (1994) ยังได้รายงานไว้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากใบถั่วแถบอะเมซอนในประเทศเปรู สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ การเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เทียบเท่าหรือดีกว่าสารเคมี benomyl (530 µg/ml)

สำหรับการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี dual culture คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคได้ 49.09 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ชนิดอื่นๆ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 35.79- 45.91 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ซึ่งได้นำมาทำการทดลองเปรียบเทียบกับ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรค 33.85 และ 30.88 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรคที่ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สอดคล้องกับการศึกษาของ Kupper *et al.*, (2003) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรค postbloom fruit drop ของส้ม ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *C. acutatum* โดยใช้เชื้อรา *T. viride*, *T. pseudokoningii* และ *T. aureoviride* โดยพบว่าการเกิดโรคในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งโรคได้เทียบเท่าสารเคมี benomyl

จากการทดลองดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าในสภาพธรรมชาติบนผลพริกหรือผลส้ม เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะสามารถเกาะติด หรือมีชีวิตรอดหรือเพิ่มปริมาณได้ (Demos and Korsten, 2006) มากกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ประกอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Kim and Chung, 2004) , (Hiradate *et al.*, 2002) อาจจะมีประสิทธิภาพดีกว่าในเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

พวกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์เช่น bacitracin มีฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ peptidoglycan ของ *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดการสะสมของ N-acetylmuramyl-pentapeptides ซึ่งเป็น peptidoglycan precursor และเข้าไปรบกวนกระบวนการ dephosphorylation ที่มีไขมันที่เป็นพาหะ ซึ่งเกิดการขัดขวางการขนส่งไขมันที่จะไปเชื่อมกับ UDP-Nuraminic-N-acetyl petapeptide ในกระบวนการสร้างผนังเซลล์

พวกยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่น Edeines

พวกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เช่น Tyrocidines และ Gramicidins โดยไปทำให้ส่วนประกอบของเมมเบรนผิดปกติ มีผลทำให้กรดอะมิโน, ฟอสเฟต ภายในเซลล์แบคทีเรีย และไอออนต่างๆ ที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ที่สำคัญในกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์เช่น K^+ ไหลออกนอกเซลล์ ทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ และการขาด K^+ ของเซลล์จะทำให้กระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์หยุดชะงักและเซลล์หยุดการเจริญ (Wolin, 1979) และกลุ่ม polymyxins ซึ่งมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ และกรดไขมันของ polymyxin จะแทรกเข้าไปยังชั้นของเมมเบรน ทำให้การเรียงตัวของส่วนไขมันของเมมเบรนผิดปกติ (มาลินี, 2525)

สารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่ผลิตจาก *Bacillus* ส่วนมากเป็นสารต้านแบคทีเรีย โดยต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ มีบางชนิดที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อรา โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์ ได้แก่ Iturin A (Bessen *et al.*, 1987), Bacilomycin (Chevanet *et al.*, 1986), Mycosubtilin (Mukhopadhyay *et al.*, 1986), Fungistatin (Korzybski *et al.*, 1978) และ Subsporin (Ebata *et al.*, 1969) ซึ่งสารต้านเชื้อรานี้ส่วนใหญ่ผลิตได้จาก *B. subtilis* Hiradate *et al.*, (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* RC-2 สร้างสารประกอบ antifungal ที่มีผลยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกซ์ของหม่อน ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *C. dematium* และเมื่อนำสารประกอบดังกล่าวไปแยกด้วยวิธี NMR และ FAB-MS พบว่าสารประกอบดังกล่าวเป็นสาร iturins

นอกจากสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ แล้ว แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ยังสามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่นอีกหลายชนิดเช่น เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ เอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ที่สามารถย่อยกรดนิวคลีอิก โดย *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิตเอนไซม์ α -amylase และเอนไซม์ β -glucanase ได้ (Fergus and Richard, 1990)

การสุ่มตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะบนผิวพริกพบว่าในทุกกรรมวิธีมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไม่แตกต่างกันและในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณไม่แตกต่างกันแต่จะเห็นว่าปริมาณน้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียซึ่งก็สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่พบในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะมีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธีและมีปริมาณน้อยกว่าในกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *T. harzianum* ด้วย Dialysis membrane technique แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถสร้างสารทุติยภูมิซึมผ่านเซลโลเฟนลงไปที่สะสมอยู่ในอาหาร PDA ได้ และช่วยให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดย อารีรัตน์ (2550) และทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermattum* ด้วยเชื้อรา *T. harzianum* โดย Intana (2003) ซึ่งในกระบวนการผลิตสารจากเมทาบอลิซึมของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นี้มีผลในการยับยั้งหรือต่อต้านการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น trichodermin trichozinianines pentyl pyrone และ oxazole เป็นต้น (Intana, 2003)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในสารกรองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวโดยนำเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไปแช่ในสารกรองก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถเจริญได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งพบว่าสารกรองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวมีส่วนช่วยให้สปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาว germ tube ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม เช่นเดียวกับการรายงานของ ชมพูนุช (2550) ซึ่งรายงานว่าสารกรองมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากในสารกรองยัง

มีส่วนของสารอาหารที่ยังเหลืออยู่ ซึ่งอาจไปมีผลกระตุ้นหรือส่งเสริมให้เชื้อโรคสามารถเจริญได้ถึงแม้ว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งอยู่ก็ตามการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าเชื้อแบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งในการยับยั้งจะมีการสร้าง clear zone เกิดขึ้น แต่ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เจริญไปคลุมทับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ได้โดยไม่มีการสร้าง clear zone ซึ่งแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 สร้างขึ้นไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides*

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 และ *Bacillus* sp. D13 ทั้งนี้เพราะแม้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 จะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* แต่ก็มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ในระดับดี

การใช้เชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ร่วมกันในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของพริกด้วยวิธี Detached Fruit Technique พบว่ามีบางกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้เพิ่มขึ้นและบางกรรมวิธีมีประสิทธิผลลดลง แต่ระดับที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันมากเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับการรายงานของ Galina *et al.*, (1998) ที่รายงานว่า การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Bacillus* spp. แต่ละชนิดหรือร่วมกันสามารถลดระดับการเกิดโรคนำระยะต้นกล้าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia* ได้ 98.5-100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ก็แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกันไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อกันมากนัก และอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำหรับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ ส่วนการตรวจปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และเชื้อรา *T. harzianum* ที่ใช้ร่วมกันในระยะเวลาต่างๆ แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน ในเวลาที่มากขึ้น จำนวนของเชื้อลดลง แต่ในระดับที่ไม่มากนัก

การใช้สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* และ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรค พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้น้อยกว่าการใช้เชื้อสด ซึ่งแสดงว่าเชื้อปฏิปักษ์ชนิดสคมักกลไกอื่นที่นอกเหนือจากการสร้างสารออกมายับยั้งเชื้อสาเหตุโรค เช่นการสร้างเส้นใยออกมาพันรัด หรือการเข้าไปทำลายภายในเซลล์ของเชื้อโรคด้วย

การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกได้เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งแรก (การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง) แต่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองครั้งแรกได้เริ่มพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะที่ผลพริกแก่เต็มที่ ในขณะที่การทดลองในครั้งที่ 2 เริ่มพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตั้งแต่ระยะที่ผลมีอายุ 7 วัน หลังดอกบาน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ในระดับที่สูงขึ้น

สำหรับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก พบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่สูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว แต่สูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยว ในขณะที่การใช้เชื้อรา *T. virens* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรค stem canker ของมันฝรั่งได้ดีกว่าการใช้เชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเดี่ยว (Brewer and Robert, 2005) และ Duffy et al., (1996) รายงานว่าการใช้เชื้อรา *T. koningii* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมโรค take-all ของข้าวสาลี มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตข้าวสาลี เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* อย่างเดี่ยว แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. koningii* อย่างเดี่ยว แต่มีผลในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อรา *T. koningii* อย่างเดี่ยว และจากผลการทดลองจะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 แม้ว่าจากการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* จากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่สูงขึ้นในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นอิทธิพลจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

สำหรับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสมีรายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* TrH40 สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลเงาะหลังการเก็บเกี่ยวได้ โดยการจุ่มผลเงาะในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* TrH40 (10^9 conidia/ml) เป็นเวลา 15-20 นาที (Sivakumar *et al.*, 2001) และ Freman *et al.*, (2004) รายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* T-39 ซึ่งเป็นชีวภัณฑ์ TRICHODEX มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส (*C. acutatum*) ของสตรอเบอร์รี่ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ Bankole and Adebajo (1996) ใช้เชื้อรา *T. viride* ที่แยกได้จากใบถั่ว cowpea เพื่อควบคุมโรค brown blotch ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *C. truncatum* ในถั่ว cowpea ในสภาพแปลง และพบว่า การพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. viride* ดังกล่าว 1 หรือ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อรา *C. truncatum* หลังจากปลูกต้นกล้าไปแล้ว 3 วัน การเกิดโรค brown blotch ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และถั่ว cowpea ให้ผลผลิตมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อรา *T. viride*

การใช้เชื้อรา *T. harzianum* สลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกไม่แตกต่างจากการใช้ร่วมกัน

การประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลง สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด

อรพรรณ และ จุมพล (2549) ศึกษาการใช้ชีวภัณฑ์สำเร็จรูป TopBS (เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*) พ่นพริกทำให้พริกเกิดโรคเพียง 41.6 เปอร์เซ็นต์และไม่แตกต่างทางสถิติกับปริมาณผลพริกที่เป็นโรคจากแปลงซึ่งพ่นด้วยชีวภัณฑ์สำเร็จรูป Larminar and Rotary ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ผลิตเป็นการค้าอยู่ในปัจจุบัน โดยจำนวนผลพริกที่เป็นโรคจากทั้ง 3 แปลงที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้ง 3 ชื่อการค้า มีจำนวนผลพริกที่เป็นโรคน้อยกว่าจำนวนผลพริกที่ไม่มีการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Korsten (1998) ซึ่งได้รายงานว่า การพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* หรือ *B. licheniformis* ก่อนเก็บเกี่ยว สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในระดับแปลงได้

He *et al.*, (2003) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BS-2 และ BS-1 ซึ่งแยกได้จากใบและลำต้นพริกเพื่อควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในระยะต้นกล้าได้ 66-93% และควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลได้พริกได้ 60-100% เช่นเดียวกับการทดลองของ Kupper *et al.*, (2003) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรค postbloom fruit drop ของส้มในระดับแปลง และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคได้ไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมี benomyl

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชอื่น เช่น การยับยั้งเชื้อรา *C. lagenarium* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของแตงโม โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* MET0908 มีการสร้าง antifungal protein ที่มีผลยับยั้งเชื้อรา *C. lagenarium* และเมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวมีผลต่อการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. lagenarium* (Kim and Chung, 2004)

การสำรวจเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวพริกที่พ่นในสภาพแปลงหลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครบทั้ง 4 ครั้ง ยังพบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในปริมาณใกล้เคียงกันทุกการทดลอง คือ 10^2 CFU ต่อตารางเซนติเมตร มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายและการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *T. harzianum* C65 พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* C65 ที่ใช้เพื่อควบคุมโรค stem-end rot ของกีวี่ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนใบ ดอก และผลของกีวี่ได้ตลอดฤดูและการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* C65 ไปหนึ่งครั้งในช่วงต้นฤดูร้อนยังสามารถตรวจพบสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* C65 บนใบและผลกีวี่ได้หลังจากเก็บผลผลิตในช่วงปลายฤดูร้อนและยังตรวจพบเชื้อรา *T. harzianum* C65 บนใบและผลกีวี่ที่ไม่ได้พ่นเชื้อรา *T. harzianum* C65 ในระยะ 3 เมตรด้วย ซึ่งสันนิษฐานว่า thrips ที่พบมากในสวนจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเชื้อรา *T. harzianum* C65 ด้วยนอกเหนือจากแรงลม (Dodd *et al.*, 2004) และ Moody *et al.*, (1999) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของเชื้อราบนผิวใบต่อรังสี UV-B และรายงานว่าเชื้อรา *T. viride* ที่ตรวจพบบนใบจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ sensitive ต่อรังสี UV-B แต่การได้รับรังสี UV-B (290-315 nm) จะทำให้อัตราการเจริญของเส้นใยลดลงบ้าง (< 5%) และการงอกของสปอร์ลดลง 0-20 % อย่างไรก็ตามในภาพที่ 8 (ง) ซึ่งแสดงการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคบริเวณแผลบนผลพริกของเชื้อรา *T. harzianum* ชี้ให้เห็นถึงผลประโยชน์ในการลดปริมาณเชื้อโรคลงได้ กล่าวคือเมื่อผลพริกที่เป็น

โรคนั้นร่วงลงดิน เชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งเป็นเชื้อราในดินอยู่แล้วย่อมสามารถทำลายแหล่ง inoculum ต่อไปของเชื้อโรคได้ด้วย

การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในสภาพแปลงในครั้งที่ 2 ต้องเก็บผลการทดลองเร็วกว่าที่กำหนด คือผลพริกยังมีอายุ 3 สัปดาห์ และไม่มีการพ่นเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* ทั้งนี้เป็นเพราะในช่วงที่ทำการทดลอง ตรงกับช่วงมรสุม มีฝนตกติดต่อกันทุกวัน ทำให้มีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคมก ประกอบกับมีเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* อยู่ในแปลงแล้วจากการทดลองในครั้งที่ 1 อย่างไรก็ตามผลการทดลองก็เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการทดลองใน ครั้งที่ 1

ผลการตรวจปริมาณเชื้อโรคบนผิวของผลพริก แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิด ไม่ว่าจะใช้แบบเดี่ยวหรือใช้ร่วมกัน สามารถลดปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมี mancozeb ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ดังกล่าว มีการปลดปล่อยสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ออกมา และไปขัดขวางการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยทำให้เส้นใยเชื้อรามีลักษณะที่เปลี่ยนไปคล้ายกับการเกิด lysis รวมทั้งทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Korsten, 1998; ชมพูนุช, 2550; อารีรัตน์, 2550)

การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ทั้งสองสายพันธุ์ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.165 แล้วทำให้ปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดที่ตรวจพบบนผิวของผลพริกลดลง 2-3 เท่า นั้น อาจเกิดจากการผสมเชื้อสองชนิดในปริมาณที่เท่ากัน (อัตรา 1:1 โดยปริมาตร) ทำให้ปริมาณเชื้อแต่ละชนิดลดลงครึ่งหนึ่ง ขณะที่สารทุติยภูมิที่เชื้อทั้งสองชนิดสร้างขึ้นมามีผลกระทบซึ่งกันและกันจนทำให้สปอร์หรือเซลล์บางส่วนสูญเสียความมีชีวิตไป

อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เชื้อรา *Trichoderma* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในสภาพแปลงยังเป็นสิ่งที่พึงกระทำได้ และสมควรกระทำ แม้ว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกจะไม่สูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยว แต่เนื่องจากปัจจุบันนอกเหนือจากโรคแอนแทรคโนสแล้วโรคของพริกยังมีอีกหลายชนิดที่เป็นปัญหาสำคัญ เช่น โรคใบจุด โรคเหี่ยว โรคเน่าระดับดิน โรคโคนเน่า โรคยอดเหลืองที่เกิดจากการขาดธาตุ ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกิดจากการที่ระบบรากได้รับความเสียหาย จึงทำให้เกิด

อาการเหี่ยว หรือสูญเสียความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหาร และโดยทั่วไปเชื้อรา *Trichoderma* ซึ่งเป็นเชื้อราในดินจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ได้ และมีคุณสมบัติในการครอบครองรากได้ด้วย ดังเช่น Lewis and Lunsden (2001) รายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* (TRI-4) และ *T. virens* (GI-3) สามารถลดการเกิดโรค damping-off ของต้นกล้าพริกที่อายุ 4 สัปดาห์ได้ ในขณะที่เดียวกันเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ก็มีรายงานว่าสามารถลดการเกิดโรค Phytophthora blight ของพริกได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม และทำให้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Jiang, 2006) ซึ่งในปัจจุบันการปลูกพริกในประเทศไทยก็มักจะประสบกับปัญหาเหล่านี้ ดังนั้นการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดร่วมกัน อาจเกิดผลดีในกรณีของการส่งเสริมการควบคุมโรคอื่นๆ นอกเหนือจากโรคแอนแทรคโนสได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดเพราะมีการสร้างสารออกมายับยั้งทำให้เกิด clear zone และเจริญอย่างรวดเร็วรวมทั้งสร้างสปอร์มากและสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด

การทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* กับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่าเชื้อแบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ซึ่งในการยับยั้งจะมีการสร้าง clear zone เกิดขึ้น แต่ในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เจริญไปคลุมทับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 ได้โดยไม่มีการสร้าง clear zone ซึ่งแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. D13 สร้างขึ้นไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides*

สำหรับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ร่วมกันในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกด้วยวิธี detach fruit พบว่ามีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้เพิ่มขึ้นและบางสายพันธุ์มีประสิทธิผลลดลง แต่ระดับที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันมากเมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ปฏิชีวนะตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว การใช้สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* และ *Bacillus* spp. ในการลดการเกิดโรค พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้น้อยกว่าการใช้เชื้อสด

การประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองโดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 และ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 และ *Bacillus* sp. D13 โดยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิชีวนะบนผลพริกที่มีอายุ 7 วัน หลังดอกบานเต็มที่ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 ที่ใช้แบบเดี่ยวมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด ส่วนการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มี

ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แบบเดี่ยวแต่ดีกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยว สำหรับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* พ่นสลับกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ก็ให้ผลในทำนองเดียวกับการใช้เชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน

การทดลองในระดับแปลง 2 ครั้งได้เลือกใช้เชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 หรือ T50 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 พ่น 4 ครั้ง พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง คือการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 แบบเดี่ยวร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01 หรือ T50 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BB165 แต่ดีกว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* แบบเดี่ยว

ข้อเสนอแนะ

การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. หรือเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกให้ได้ผลดี อาจต้องใช้ตั้งแต่ระยะการเตรียมแปลง โดยผสมไปกับวัสดุปลูกหรือดินก่อนปลูกพริก และต้องใช้อย่างต่อเนื่องตลอดฤดูปลูกประมาณอาทิตย์ละ 1 ครั้ง เพื่อให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญเข้าครอบครองรากและทุกส่วนของต้นพริก ตลอดจนกระตุ้นความต้านทานโรค และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริก รวมทั้งช่วยป้องกันเชื้อสาเหตุโรคอื่นๆ โดยอาจใช้ควบคู่ไปกับสารเคมี mancozeb ในกรณีที่พบว่าเกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในฤดูฝน ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและช่วยลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ลงในระยะถัดไป สำหรับการผลิตพริกที่ปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เคลือวัลย์ คาวงษ์. 2548. การผสมสายพันธุ์กลายของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Rifai) ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur) โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 323 น.
- จิระเดช แจ่มสว่างและ วรณวิไล อินทนู. 2545. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. น. 114-122. ในรายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 20 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- จิรัชสา มีกลิ่นหอม. 2546. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- เฉลิมเกียรติ โกภาวัฒนา. 2540. พริก. เกษตรก้าวหน้า 12 (2): 15-16.
- ชมพูนุช บุญราชแขวง. 2550. อิทธิพลจากสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ดนัย บุญเกียรติ. 2545. การควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่โดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- บรรเจิด อินทว้าง และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2529. การควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* Kuehn) โดยจุลินทรีย์จากดินเกษตรกรรม, น. 173-185. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาพืช) ครั้งที่ 24, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บุญญาวดี จิระวุฒิ. 2540. การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริกและถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคส่วนเมล็ดและต้นกล้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประคอง เย็นจิตต์. 2547. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ปฏิบัติในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ในระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปริญญา จันทศรี นิพนธ์ ทวีชัย วิชัย โหมสิทธิ์ตันและ วิวัฒน์ แดงสุภา. 2533. การควบคุมโรคเน่าและของมันฝรั่งโดยชีววิธี., น. 467-476. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาพืช) ครั้งที่ 28, 29-31 มกราคม 2533. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- แพรทอง ละมุล. 2549. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรครากเน่าของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนา เอนกรณโชติ. 2542. ปฏิกริยาที่มีต่อกันระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกับพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2525. ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ, ยาฆ่าเชื้อและสารปฏิชีวนะ). โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์, กรุงเทพฯ. 442 น.

วราภรณ์ สุทธิสา. 2544. การคัดเลือกและใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมลมาศ โอสธเสน. 2546. การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและสภาพสวน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วุฒินิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริทิพย์ แดงดีบ. 2548. การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis asparagi* Bubak. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ สอกะวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 249น.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 198น.

สถาบันการแพทย์แผนไทย. 2538. ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของชาวมัธยมศึกษา. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 190 น.

สมศิริ จิวสกุล. 2521. เชื้อราวิทยาการถ่ายทอดทางเมล็ดของโรคแอนแทรกโนสของพริกและประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคบนใบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุณิรัตน์ สิมะเคื้อ. 2540. การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากเน่าของส้มเขียวหวาน ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพรรณ วิเศษสังข์และ จุมพล สารนาน. 2549. การบริหารโรคกุ้งแห้งของพริก. รายงานผลการทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช หน้า 456-463.

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อุดม ฟาร์รุ่งสา. 2530. รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การศึกษาโรคที่สำคัญของพืชผักเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ถูกผสมครั้งที่ 1. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุไรจันทา กลีกรรณไพบูรณ์ วิชัย โหมสิทธิ์รัตน์ นิพนธ์ ทวีชัย และ ลอลิตา เมฆสองสี. 2535. ผลของแบคทีเรียและแอนทาโกนิสต์ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. น. 321-328. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adikaram, N.K.B., A.E. Brown and T.R. Sinburne. 1982. Phytoalexin involvement in the latent infection of *Capsicum annuum* L. fruit caused by *Glomerella cingulata* (Stonem.). *Physiol. Plant Pathol.* 21: 161-170.

Alexander S.A. and J.K. Marvel. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* cause severe anthracnose disease on pepper in Virginia. **Meeting Abstracts** October 17-19, 2001. Cromwell, Connecticut.

Andrews, J. 1984. **Peppers: The Domesticated capsicums**. University of Texas Press, Austin, Texas, USA. 170 p.

Bankole, S.A. and A. Adebajo. 1996. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. **Crop Protection**. 15: 633-636.

- Ben, A.R. 1975. Benzimidazole penetration distribution and persistence in postharvest treated pears. **Phytopathol.** 65 : 1187.
- 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.
- Brewer, T. M. and L.P. Robert. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protect.** 35: 25-32.
- Carlile, W.R. 1988. Pre-harvest fungicides, pp. 356-358. In Cited by P. Jeffries, J.C. Dodd, M.J. Jeger and R.A. Plumbley. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crop. **Plant Pathol.** 39: 343-366.
- Chamswarnng, C. and C. Tanangsanakul. 1996. UNIGREEN UN-1® (*Trichoderma harzianum*): The first registered biofungicide in Thailand. In **Proceeding of the International Symposium on Biopesticides**. 27-31 October 1996. Phitsanulok, Thailand.
- Chevanet, C., F. Besson and G. Michel. 1986. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. **Can. J. Microbiol.** 32: 254-258.
- Cooper, A.J. 1979. **The ABC of NFT: Nutrient Film Technique**. Grower Book, London.
- Cordoba, M.A. 1992. Pruba d fungicides para el combate quimico de la anthracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en mango (*Mangifera indica* L.). Ing. Agric. Thesis. Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. (**Abstract in English**)
- De Jager, E.S. 1999. **Microbial ecology of the mango flower, fruit and leaf surfaces**. MSc Thesis. University of Pretoria.

- Demoz, B.T. and L. Korsten. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. **Bio. Control** 37: 68-74.
- Dickman, M.B., and A.M. Alvarez. 1982. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Dis.** 67: 748-750.
- _____, S.S. Patil and P.A. Koltukudy. 1983. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides*. Penz. On *Carica papaya* L. **Physiol. Plant Pathol.** 20: 333-347.
- 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. **Australasian Plant Pathology** 33: 189-196.
- Duffy, K.B., A. Simon and D.M. Weller. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with Fluorescent *Pseudomonas* for control of Take-all on wheat. **Phytopathol.** 86: 188-194.
- Ebata, M., K. Miyazaki and Y. Takahashi. 1969. Studies on subsporin. I. Isolation and characterization of subsporins A, B and C. **J. of Antibiotics** 22: 467-472.
- Eckert, J.W. 1983. Control of Postharvest Disease with Antimicrobial Agents, pp. 256-283. **In Post-harvest Physiology and Crop Presentation.** McGraw-Hill Book Co., New York.
- _____, M.J. Kolbezen, M.L. Rahm and K.J. Eckard. 1979. Influence of benomyl and methyl 2-benzimidazole carbamate on the development of *Penicillium digitatum* in the pericarp of orange fruit. **Phytopathol.** 69: 934.

- Fergus, G.P. and J.S.Richard. 1990. Fermentation of *Bacillus* p.73. In **O.J. Neway. (ed).**
Fermentation process Development of Industrial Organisms. Dekker, New York.
- Frean, R.T. 1985. Pre-harvest fungicides, pp. 350-358. Cited by P. Jeffries, J.C. Dodd, M.J.
 Jeger and R.A. Plumbley. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical
 fruit crop. **Plant Pathol.** 36: 343-366.
- Freeman S., O. Minz, I. Kolesnik, O. Barbul, A. Zveibil, M. Maymon, Y. Nitzani, B. Kirshner, D.
 Rav-David, A. Bilu, A. Dag, S. Shafir and Y. Elad. 2004. *Trichoderma* biocontrol of
Colletotrichum acutatum and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **Eur.J.Plant**
Pathol. 110: 361-370.
- Frevel, D.R. and H.W. Spurr. 1977. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus*
 subsp. *Mycoides* in a controlled environment. **Phytopathol.** 67: 930-932.
- Galina, E., S. Sudo and D.J. Siliva. 1998. Biological control of tobacco seeding damping-off.
 p.127. In **Brighton congress. (abstr).**
- Giffie, P.J. 1973. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*.
Transactions of the British Mycological Society 60: 433-439.
- Gill, N.T. and K.C. Vear. 1980. Solonaceae, pp. 117-135. In K.C. Vear and D.J. Bamard (eds.).
Agricultural Botany Dicotyledon Crops. The Garden City Press Limited., London.
 268 p.
- Grover, R.K. and R.D. Benson. 1970. Seed-borne nature of *Colletotrichum capsici* in chilli
 seeds and its control by seed dressing fungicides. **Indian Phytopathol.** 23: 664-668.

- He H., X.Q.Cai, X. Guan and F.P. Hu. 2003. Biological control of capsicum anthracnose by endophytic *Bacillus subtilis* BS-2 and BS-1. **ACTA Phytopathologica Sinica** 33: 170-173.
- Higgins, B.B. 1926. Anthracnose of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Phytopathology**. 16: 333-343.
- Hiradate, S., S. Yoshida, H. Sugie, H. Yade and Y. Fjii. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochemistry**. 61: 693-698.
- 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, Bangkok.
- Jeffries, P., J.C. Dodd, M.J. Jeger and R.A. Plumbley. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* specis on tropical fruit crops. **Plant Pathol.** 39: 343-366.
- Jiang, Z.Q., Y.H. Guo, S.M. Li, H.Y. Qi and J.H.Guo. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. **Bio. Control**. 36: 216-223.
- Johnson, L.F and E.A.Curl. 1972. **Methods of research on the soil bone plant pathogens.** Burgess Publishing Company, Minnesota. 241p.
- Juangbhanich, P. and C. Chana. 1975. Efficacy of some fungicide against seed borne infection of *Colletotrichum* anthracnose and Ripe rot of pepper. (*Capicum frutescens*). **Kasetart Journal**. 9: 115-119.

- Kelemu, S. and J.L. Badel. 1994. In vitro inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and other phytopathogenic fungi by an Amazonian isolate of *Bacillus subtilis* and its cell-free culture filtrate. **Australasin Plant Pathology**. 23: 41-45.
- Kim, B.S. 1986. Resistance to Phytophthora root rot in introduced peppers (*Capsicum* spp.). **J. Kor. Soc. Hort. Sci.** 27(1): 11-14.
- _____, H.K. Park. and W.S. Lee. 1990. Resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper, pp. 184-188. *In* : S.K. Green, T.D. Griggs and B.T. Mcleand, (eds.). Tomato and Pepper Production in the Tropics. **Proc. Intl. Symp. Integr. Mange.** Practices, 1st AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Kim, P. and K.C. Chung. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters** 234: 177-183.
- King, W.T., L.V. Madden, M.A. Ellis and L.L. Willson. 1997. Effect of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* spp. infecting strawberry fruit. **Plant dis.** 81: 77-84.
- Koomen, I. and P. Jeffries. 1993. Effects of antagonistic microorganism on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant Pathol.** 42: 230-237.
- Korsten, L. 1998. Biological control potential against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Abstracts of papers presented at an International workshop on Host Specificity, Pathology and host pathogen interaction of Colletotrichum.** Jerusalem, Israel.
- Korzybski, T., Z.K. Gindifer and W. Kurylowicz. 1978. Fungistatin, pp. 1612-1613. *In* **Antibiotics Origin, Nature, and Properties.** American Society for Microbiology, Washington. D.C.

- Kuo, K.C. 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicides Prochloraz in Taiwan. **Proc. Natl. Sci. Counc.** 25(3): 174-179.
- Kupper, K.C., N.G. Fernandes and A.de Goes. 2003. Biological control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of citrus postbloom fruit drop disease. **Fitopatologia Brasileira** 28: 251-257.
- Lewis, J.A. and R.D. Lumsden. 2001. Biological of damping-of greenhouse-grown crops causedby *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop protection.** 20: 49-56.
- Lewis M.L., C.N. Diaaz and S.A Miller. 2004. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Dis.** 88: 1198-1204.
- Matthias L. P., W. Simone, M. Monika, D. Genevieve and D. Brion. 2004. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. **FEMS Microbiol. Ecol.** 48: 455-477.
- McMillan, R.T. 1972. Enhancement of anthracnose control on mango by combining copper with Nui-film-17. **Pro.Fla.State Hort.Sci.** 85: 268-270.
- _____. 1999. Evaluation of fungicides for control of lychee anthracnose. Caribbean Division **Meeting Abstracts** June 21-25 San Juan, Puerto Rico.
- Meon, S. 1980. Pectinolytic and cellulolytic enzyme production by *Colletotrichum capici* Buttes & bisby. **Malays.** 2: 105-110.
- Moody, S.A., K.K. Newsham, P.G. Ayres and N.D. Paul. 1999. Variation in the responses of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290-315). **Mycological Research** 103: 1469-1477.

- Mortuza, M.D. 1997. **Effects of antagonists, alum and ultraviolet irradiation on major fruit rots of banana (*Musa sapientum*)** Kontze. College, Laguna (Phillippines). 138p.
- Mukhopadhyay , N.K., S. Majumder and S.K. Bose. 1986. Characteristic of three-fraction mycobacillin Synthetase, **Biochem. J.** 235: 639.
- Nonnecke, I.L. 1989. **Vegetable Production.** Van. Nostrand Reinhold, New York. 657p.
- Peirce, L.C. 1987. **Vegetable Characteristics.** Production and Marketing. John Wiley & Son, Inc., USA. 433p.
- Pring, R.J., C. Nash, M. Zakaria and J.A. Bailey. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiol. and Molec. Plant Pathol.* 46: 137-152.
- Reddy, M.S., S. Ramapandu and A.P. Rao. 1980. Cross resistance of fungicide resistant strains of *Gloeosporium ampelophagum*, *Colletotrichum capsici* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to other fungicides. **Indian Phytopathol.** 33: 450-455.
- Riker, A.J. and R.S. Riker. 1936. **Introduction to Research on Plant Disease.** John. S. Swift. Co. St. Louis. Mo.
- Rocha, J. R. and N. Oliveira. 1998. Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose agent on passion fruit (*Passiflora edulis*), with *Trichoderma koningii*. **Phytopathologia** 24: 272-275.
- Rudresh, D.L., M.K. Shivaprakash and R.D. Prasad. 2004. Effect of combined application of *Rhizobium* phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. On growth, nutrient uptake and yield of chickpea. **Appl. Soil Ecol.** 22: 103 –110.

- Santos, B.L., G.D. Paredes and F.R. Munoz. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum* causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plant. **Crop Protect.** 21: 11-15.
- Sarian, M. 1989. Detection of benomyl resistance in the anthracnose pathogen *Colletotrichum capsici*. **Journal of Islamic Academy of science.** 2: 168-171.
- _____. 1994. Potential of *Bacillus* spp. as biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. **Malay. Appl. Biol.** 23 (1-2): 53-60.
- Schaad, N.W. 1980. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** The Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota.
- Simon, A., R.W. Dunlop, E. L. Ghisalberti, and K. Sivasithamparam. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. **Soil Biol. Biochem.** 20: 263-264.
- Sivakumar, D., R.S. Wilson, F.M. Wijeratnam, M.T. Marikar, M. Abeyesekere and R.L.C. Wijesundera. 2001. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutans. **Acta Hort.** 553.
- _____, R.L.C. Wijesundera and M. Abeyesekere. 2002. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. **Crop Protect.** 21: 847-852.
- Smith, R.W. and D.F. Crossan. 1958. The taxonomy, etiology and control of *Colletotrichum piperatum* (E.&E.) E.&H. and *Colletotrichum capsici* (Syd.) B.&B. **Plant Dis. Repr.** 42: 1099-1103.
- Spalding, D.H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest disease. **Plant Dis.** 66: 1185 -1186.

- Soglio, D. and F. Kessler. 1995. **Effect of soil pH and temperature on the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus megaterium* and *Trichoderma harzianum***. University of Illinois at Urbana-Champaign. 165 pp.
- Sohi, H.S., S.S. Sokhi and R.P. Tiwari. 1973. Studies on the storage rot of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and its control. **Phytopath. Mediteranea** 12: 114-116.
- Whipps, M.J. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne grasshopper pathogens and antagonistic fungi. **New Phytologist**. 107: 127-142.
- _____. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. 52: 487-511.
- Wolin, M.J. 1979. Physical agent, bactericidal substances, and chemotherapeutic drugs, pp. 121-156. In B.A. Freeman (ed.). **Textbook of Microbiology**. 21st ed., W.S. Saunders Company. Philadelphia.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ภาคผนวก ก

สายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิบัติ

ตารางผนวกที่ ก1 สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิบัติที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์	แยกได้จาก
B03 <i>Bacillus cereus</i>	ดินบริเวณรากส้ม สามารถควบคุมโรครากเน่าของส้ม ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Phytophthora parasitica</i> (สุธีรัตน์, 2540) และสามารถควบคุมโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i> (ศิริทิพย์, 2548)
CG06 <i>B. amyloliquefaciens</i>	ผิวใบมะม่วง (วราภรณ์, 2544) สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผิวใบมะม่วง ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (วิมลมาศ, 2546)
CG30 <i>B. amyloliquefaciens</i>	ผิวใบมะม่วง สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผิวใบมะม่วง ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (วิมลมาศ, 2546)
CH4 <i>B. subtilis</i>	สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i> (อุไรจันทา และคณะ, 2535)
CH6 <i>B. subtilis</i>	ดินในแปลงปลูกมันฝรั่งที่เป็นโรคเน่าและ สามารถควบคุมโรคเน่าและของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (ปริญญญา และคณะ, 2533)
BB165 <i>Bacillus</i> spp.	ผิวผลมะม่วง สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง น้ำดอกไม้ ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ประคอง, 2547)
D13 <i>Bacillus</i> spp.	ได้รับอนุเคราะห์จากคุณถวัลย์ คุ่มช้าง
WS16 <i>B. cereus</i>	ผิวใบคะน้า สามารถควบคุมโรคใบจุดของคะน้า ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> (วราภรณ์, 2545)
DGg13 <i>B. amyloliquefaciens</i>	ผิวใบพริก (จิรัสสา, 2547)

ตารางผนวกที่ ก2 สายพันธุ์เชื้อราปฏิบัติที่ใช้ทดลอง

สายพันธุ์	แยกได้จาก
CB-Pin-01 <i>Trichoderma harzianum</i>	ดินปลูกสับปะรด จ.ชลบุรี (บรรเจิด และจิระเดช, 2529) และเป็นสายพันธุ์การค้าที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจาก ผศ. ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง ม. เกษตรศาสตร์ ศูนย์วิทยุณิชีดส์ ในชื่อผลิตภัณฑ์ยูนิกรีน (Chamswarn and Tanangsanakul, 1996)
T50 <i>T. harzianum</i>	สวนทุเรียนคุณเม่ง จ. สงขลา สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และสามารถควบคุมโรครากเน่าของต้นแตงกวา ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> ได้ดี (Intana, 2003)
T152 <i>T. harzianum</i>	สวนกล้วยคุณสุรชา ต. บางบัวทอง จ. นนทบุรี ผลิตสาร harzianic acid, harzianic acid isomer และเพิ่มน้ำหนักสดของรากและต้นแตงกวาได้ดี (Intana, 2003)
PM9 (PRM9) <i>T. harzianum</i>	สายพันธุ์กลายจากสายพันธุ์ T50 ด้านทานไฟโรฟิโคนาโซลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Phytophthora parasitica</i> ได้ดี (เคลือวัลย์, 2548)
71-42 <i>T. harzianum</i>	ดินในสวนทุเรียน จ. จันทบุรี (วารุณี, 2546)
DU-07 <i>T. pseudokoningii</i>	ดินในสวนทุเรียน จ. จันทบุรี (วารุณี, 2546)
GV <i>T. virens</i>	ดินในสวนทุเรียน จ. จันทบุรี (วารุณี, 2546)

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้หลังจากเตรียมเสร็จแล้วให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (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
Peptone	5	กรัม
Rose Bengal	0.032	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำสะอาด	1	ลิตร
Streptomycin	1	กรัม

ละลาย Rose Bengal ในน้ำก่อนผสมกับสารตัวอื่น จากนั้นค่อยนำไป autoclave ส่วน Streptomycin ให้ใส่ก่อนจะเทอาหาร

ภาคผนวก ค

สูตรสารละลายธาตุอาหาร (ปุ๋ยน้ำ) ที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ก

สูตรสารละลายธาตุอาหาร (ปุ๋ยน้ำ) ที่ใช้ในการทดลอง

ดัดแปลงจาก Coper (1979) โดยอาจารย์ยงยุทธ เจริญไชยศรี

Stock A

Calcium nitrate	1,120	g
Fe EDDHA	100	g
ผสมน้ำสะอาด กวนจนละลายหมด จึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 5 ลิตร		

Stock B

Potassium nitrate	590	g
Magnesium sulfate	590	g
Potassium phosphate (mono)	270	g
Nicspray®	30	g
ผสมน้ำสะอาด กวนจนละลายหมด จึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 5 ลิตร		

นิค-สเปรย์ (Nic-spray): ประกอบด้วยธาตุอาหาร 8 ชนิด ดังต่อไปนี้

แมกนีเซียม (MgO)	7.50	เปอร์เซ็นต์
เหล็ก (Fe)	1.80	เปอร์เซ็นต์
ทองแดง (Cu)	1.90	เปอร์เซ็นต์
แมงกานีส (Mn)	2.00	เปอร์เซ็นต์
สังกะสี (Zn)	2.00	เปอร์เซ็นต์
โบรอน (B)	0.023	เปอร์เซ็นต์
โมลิบดีนัม (Mo)	0.050	เปอร์เซ็นต์
นิกเกิล (Ni)	0.050	เปอร์เซ็นต์

จำหน่ายโดย: บริษัทเวสโก้เคมี ประเทศไทย จำกัด (แพรทอง, 2549)

เมื่อต้องการนำไปใช้ ให้ผสมน้ำสะอาด: Stock A: Stock B เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 40 ลิตร: 200 มิลลิลิตร: 200 มิลลิลิตร

วัดค่า EC ให้อยู่ในช่วง 2-3 ms/ cm² จากนั้นปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 50% ให้อยู่ในช่วง 5.5-6.0

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	วราภรณ์ บุญเกิด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	4 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2549)