



วิทยานิพนธ์

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
ที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer

Using Antagonistic Bacteria to Control Potato Early Blight
Disease Caused by *Alternaria solani* Sorauer

นายหฤษฎ์ นิมรักษา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์คหกรรมศาสตร์ (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช สาขา โรคพืช ภาควิชา

เรื่อง การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
ที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer

Using Antagonistic Bacteria to Control Potato Early Blight

Disease Caused by *Alternaria solani* Sorauer

นามผู้วิจัย นายหฤษฎ์ นิ่มรักษา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์อ่ำไพพรรณ ภราดรน์วัฒน์, วท.ค.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เลขา มาโนช, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิจารณ์ วิชชุกิจ, Dr.sc.agr)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ สິงห์บุระอุดม, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
ที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer

Using Antagonistic Bacteria to Control Potato Early Blight Disease

Caused by *Alternaria solani* Sorauer

โดย

นายทฤษฎ์ นิ่มรักษา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2551

หุฤษฎ์ นิ่มรักษา 2551: การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer ปรินญาวิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (โรคพืช) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรธานกรรการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์อ่ำไพวรรณ กรารคร์นุวัฒน์, วท.ค. 100 หน้า

ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นปฏิชีวนะของแบคทีเรียซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินและผิวใบมันฝรั่งในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย พบแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลทจากจำนวน 509 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง (potato early blight) โดยแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 และแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs044 มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 73.67 % และ 70.65 % ตามลำดับ สำหรับสารทุติยภูมิที่แบคทีเรียปฏิชีวนะสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud's Glucose Broth (SGB) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เมื่อนำมาทดลองเปรียบเทียบกับสารเคมี benomyl พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุของโรค 78.45 % และ 72.78 % ตามลำดับ แบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 ไอโซเลทมีคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน ฟอสเฟต และไขมัน โดยไอโซเลท PAOs044 สามารถย่อยโปรตีนและฟอสเฟตได้ดี ส่วนไอโซเลท CMs026 สามารถย่อยไขมัน ได้ดี การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะโดยใช้สารพา (carrier) 4 ชนิด คือ dolomite, talcum power, hyflo supercell และ diatomaceous earth เพื่อใช้สำหรับงานควบคุมโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงทดลอง โดยมีความเข้มข้นของแบคทีเรียปฏิชีวนะเริ่มต้นที่ 10^{16} cfu/ml ผสมกับสารพาแต่ละชนิด พบว่า dolomite มีคุณสมบัติของการเป็นสารพาที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

แบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 ไอโซเลทในลักษณะของเซลล์แขวนลอย สารทุติยภูมิและผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง โดยเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benomyl พบว่าสารเคมี benomyl สามารถควบคุมโรคทั้งในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและสภาพแปลงทดลองได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายของโรคเพียง 11.67% และ 10.00% ตามลำดับ รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท CMs026 ในลักษณะเซลล์แขวนลอย สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายของโรค 23.33% ในเรือนปลูกพืชทดลอง และ 10.83% ในแปลงทดลอง

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิชีวนะโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่า แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMS026 คือ *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs044 คือ *Bacillus* sp.

Harit Nimraksa 2008: Using Antagonistic Bacteria to Control Potato Early Blight Disease Caused by *Alternaria solani* Sorauer. Doctor of Philosophy (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Ampaiwan Paradornuwat, Ph.D. 100 pages.

Isolation and efficacy test of antagonistic bacteria for biological control of potato early blight disease were carried. From potato leaves surface and planted soil, 509 isolates of bacteria were investigated. Efficacy test was studied on growth inhibition of *Alternaria solani* and twenty two isolates were reported with antagonistic properties. Among those isolates, CMs026 and PAOs044 isolates were shown the antagonistic properties with inhibition growth percentage of 73.67 and 70.65, respectively. The antifungal secondary metabolites activities produced by the 22 isolates on artificial media, Sabouraud's glucose broth (SGB), were also studied. Compared with benomyl, supernatant from the centrifuged and sterile cultured media were observed. The CMs026 isolate shown the most effective activity with 78.45% inhibition growth and PAOs044 isolate gave inhibition growth activity with 72.78%. Bacterial enzyme activities were also investigated on decomposition of protein, phosphate and fat. The PAOs044 isolate gave good result in protein and phosphate decomposition activities while CMs026 isolate noticed as a good isolate for fat decomposition activities. Four carriers including dolomite, talcum powder, hyflo supercell and diatomaceous earth were determined for biological products formulation. Starting with concentration of 10^{16} CFU/ml, dolomite was reported as the suitable carrier for biological product development.

Biocontrol activities of CMs026 and PAOs044 isolates in formulations of cell suspensions, secondary metabolites and biological products were examined *in vivo*. Efficacy tests on tomato early blight in greenhouse conditions and potato early blight in field trial conditions were carried and compared with benomyl. Both in greenhouse and field trials, benomyl at recommendation rate gave the best results for disease control with disease destroying index of 11.67 % and 10.00 %, respectively. While the CMs026 isolate in formulation of cell suspension reported with destroying index of 23.33 % in greenhouse and 10.83 % in field trial.

In addition, the CMs026 isolate was *Bacillus subtilis* and the PAOs044 isolate was *Bacillus* sp., identified by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อำไพวรรณ ภราดรน์วัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ซึ่งให้โอกาส ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือตลอด การศึกษาและการดำเนินงานวิจัยวิทยานิพนธ์ รวมทั้งแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอ กราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เลขา มาโนช กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. วิจารย์ วิชากิจ กรรมการวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร. จงรักษ์ จันท์เจริญสุข ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ในการให้คำแนะนำงานวิจัย และการตรวจแก้ไข ความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของ คุณบุญสม ภมรจันทร์ ดร. จันทรวิภา ชนะโสภณ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรียา ตันติวิวัฒน์ ผู้มีพระคุณอันยิ่งใหญ่ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษาต่อ ระดับปริญญาเอก รวมถึงให้การสนับสนุนในการศึกษาต่อครั้งนี้

ขอขอบคุณ บริษัท ปู๊ไปโอนิค จำกัด ที่ได้ให้โอกาสในการทำงานและสนับสนุนให้ ทำวิจัยและศึกษาในระดับปริญญาเอก และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการแผนกวิจัย และพัฒนาจุลินทรีย์ ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ บริษัท มหาราชการเกษตร จำกัด อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ และบริษัท เบอรี่ยุคเกอร์ฟู้ด จำกัด อำเภอพญาเม็งราย จังหวัดเชียงราย เป็นอย่างยิ่ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเอื้อเพื่อแปลง ทดลองและดูแลแปลงทดลองเป็นอย่างดี

ประโยชน์อันพึงเกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย พี่สาว ที่รักยิ่ง และคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้จนถึงปัจจุบัน

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอระลึกถึงพระคุณของ คุณพ่อองค์ นิมรัถญา คุณแม่ทองย้อย นิมรัถญา บุพการีที่แม้จะล่วงลับไปแล้วแต่ยังอยู่ในใจของข้าพเจ้าตลอดเวลา ขอขอบคุณพี่ชายและพี่สาวที่ เคารพรักของข้าพเจ้า และหลายๆ ที่รักทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจตลอดเวลา

หฤษฎ์ นิมรัถญา

พฤษภาคม 2551

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PDA	=	potato dextrose agar
NA	=	nutrient agar
SGB	=	Sabouraud's glucose broth
Ca ₃ (PO ₄) ₂	=	Tri-calcium diphosphate
cfu	=	colony forming unit
g	=	gram
ml	=	millilitre
°C	=	Degree celsius
SEM	=	scanning electron microscope
CMs	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงใหม่
CM1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงใหม่
CRs	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงราย
CR1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงราย
LPOs	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำพูน
LPO1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำพูน
LPA	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำปาง
LPA1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำปาง
PAOs	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดพะเยา
PAO1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดพะเยา
TKs	=	แบคทีเรียแยกจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดตาก
TK1	=	แบคทีเรียแยกจากผิวใบในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดตาก

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลอง	26
ผล	26
วิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
สรุป	48
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	56

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ใน carrier แต่ละชนิดในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา	36
2 เพอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศภายหลังการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง	40
3 เพอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง ภายหลังการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในสภาพแปลงทดลอง	42
4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะภายหลังการฉีดพ่นในแปลงทดลองจากการฉีดพ่นในแปลงทดลอง	43
ตารางผนวกที่	
1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	60
2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	62
3 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	64

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	5
2 รูปร่างลักษณะของสปอร์ของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	6
3 การชักนำการสร้างสปอร์ของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	18
4 การคลุมต้นพืชทดลองด้วยแผ่นพลาสติกเพื่อให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค ภายหลังจากการปลูกเชื้อ	21
5 แปลงปลูกมันฝรั่งทดลอง บริษัท มหาราชบูรการเกษตร จำกัด ตำบลทุ่งสะโดก อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่	22
6 การฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ สารสกัดจากแบคทีเรีย ชีวผลิตภัณฑ์ จากแบคทีเรีย และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชในแปลงทดลอง	23
7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้ง การเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	27
8 แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	27
9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs004, CMs012, CMs026 และ CMs037 ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของ มันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน	28
10 แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs001, PAOs022, PAOs024, PAOs028 และ PAOs044 ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรค ใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน	28
11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการละลายฟอสเฟต หลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน	30
12 แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลทในการละลายฟอสเฟตหลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน	30
13 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการย่อยโปรตีน หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน	31
14 แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการย่อยโปรตีน หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการย่อยไขมัน หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน
16	แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการย่อยไขมัน หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน
17	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรค ใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
18	สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรค ใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
19	ชีวผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 ในสารพาแต่ละชนิด (แกลบ) และจำนวน โคลินี่ที่ตรวจนับได้ (แกลบ)
20	ชีวผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs044 ในสารพาแต่ละชนิด (แกลบ) และจำนวน โคลินี่ที่ตรวจนับได้ (แกลบ)
21	ความรุนแรงของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ภายหลังจากการฉีดพ่น ราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิชีวนะ (กรรมวิธีที่1-6) ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง
22	ความรุนแรงของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ภายหลังจากการฉีดพ่น ราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิชีวนะ (กรรมวิธีที่7-12) ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง
23	ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะบนผิวใบมันฝรั่งภายหลังจากการฉีดพ่นในแปลงทดลอง
24	แปลงปลูกมันฝรั่งทดลอง ก่อนและภายหลังจากการปลูกเชื้อราสาเหตุ
25	แบคทีเรียปฏิชีวนะสร้างสารทุติยภูมิทำลายเส้นใยราสาเหตุ <i>Alternaria solani</i> Sorauer บนผิวใบมันฝรั่ง อายุ 3 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อราสาเหตุ ทำให้เส้นใยของราสาเหตุเหี่ยวแฟบลง (ก และ ข)

ภาพผนวกที่

1	แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
<p>2 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	65
<p>3 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	66
<p>4 ของแบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs004, 012, 026 และ 037) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	66
<p>5 ของแบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	67
<p>6 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	67
<p>7 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	68
<p>8 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs011, 012 และ 022) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	68
<p>9 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	69
<p>10 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง</p>	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
11 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	70
12 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs014, 024 และ 042) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	70
13 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPAs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	71
14 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPAs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	71
15 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPAs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	72
16 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPAs014, 016 และ 043) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	72
17 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	73
18 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
19	74
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
20	74
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs001, 022, 024, 028 และ 044) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
21	75
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
22	75
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
23	76
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
24	76
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs046-048) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
25	77
แบบที่เรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs013, 044 และ 046) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	
26	78
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
27 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	78
28 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMI031-037) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	79
29 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	80
30 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	80
31 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	81
32 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	82
33 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	82
34 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI031-037) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	83

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
35	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง	
(ไอโซเลท LPAI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	84
36	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง	
(ไอโซเลท LPAI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	84
37	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง	
(ไอโซเลท LPAI031-037) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	85
38	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา	
(ไอโซเลท PAOI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	86
39	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา	
(ไอโซเลท PAOI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	86
40	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา	
(ไอโซเลท PAOI031-035) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	87
41	
แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก	
(ไอโซเลท TKI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	88
42	
ประสิทธิภาพของแบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก	
(ไอโซเลท PAOI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer	
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
43 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKI031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	89
44 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKI015, 016 และ 034) ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	89
45 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา <i>Alternaria solani</i> Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง	90

การใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง
ที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer

Using Antagonistic Bacteria to Control Potato Early Blight Disease
Caused by *Alternaria solani* Sorauer

คำนำ

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประชากรโลกมีปริมาณและมูลค่าของผลผลิตอยู่ในลำดับที่ 4 รองจากข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด (กรมวิชาการเกษตร, 2541) ในอดีตคนไทยบริโภคมันฝรั่งในปริมาณน้อยสำหรับการประกอบอาหารในครัวเรือน แต่ในปัจจุบันความต้องการบริโภคมันฝรั่งและผลิตภัณฑ์มันฝรั่งได้เพิ่มมากขึ้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของประเทศ จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกมันฝรั่งมากขึ้นในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศซึ่งมีอากาศหนาวเย็น โดยมีพื้นที่เพาะปลูกรวมทั้งประเทศในปี 2550 จำนวน 50,601 ไร่ ปริมาณผลผลิต 125,703 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,520 กิโลกรัม/ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551) ปัญหาที่พบสำหรับการปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย คือ การผลิตหัวพันธุ์ในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ต้องนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศทุกปี ทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสูง โดยในปี 2549 มีการนำเข้ามันฝรั่งสำหรับใช้ทำพันธุ์ปริมาณ 4,683 เมตริกตัน มูลค่า 113.50 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

ปัญหาที่สำคัญสำหรับการปลูกมันฝรั่ง คือ การระบาดของโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคที่เกิดจากรา เช่น โรคใบไหม้ (late blight) ที่เกิดจากรา *Phytophthora infestans* โรคใบจุดสีน้ำตาล (early blight) สาเหตุเกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer โรคโคนเน่าและแผลสะเก็ดดำ (stem canker and black scurf) สาเหตุจากรา *Rhizoctonia solani* โรคเหี่ยวและหัวเน่า (fusarium dry rot and wilt) สาเหตุจากรา *Fusarium* spp. และโรคเน่าต้นเหี่ยวตาย (stem rot) สาเหตุจากรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคเหี่ยว (bacterial wilt) เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โรคเน่าและ (soft rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (กรมวิชาการเกษตร, 2541) และโรคที่เกิดจากไวรัส โรคที่เกิดจากราในกลุ่มราดังกล่าวสามารถทำลายมันฝรั่งทุกระยะการเจริญเติบโต การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยมี

ปัจจัยที่ช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อ คือ ลม ฝน แมลงหรือการติดปนเปื้อนไปกับหัวพันธุ์และเครื่องมือทางการเกษตร เกษตรกรมักนิยมควบคุมโรคต่างๆ เหล่านี้ด้วยการฉีดพ่นสารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย หากแต่การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่องได้สร้างปัญหาแก่การผลิตในระยะยาว เช่นปัญหาด้านเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ปัญหาด้านโรคและแมลงศัตรูพืชที่มักเกิดความต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตซึ่งมีผลกระทบต่อผู้บริโภคและปัญหาสารพิษตกค้างหรือปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม

การควบคุมป้องกันกำจัดโรคระบาดที่ทำลายพืช โดยหลักการแล้วสามารถปฏิบัติหรือเลือกปฏิบัติได้หลายวิธีการที่นอกเหนือจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เช่น การใช้พันธุ์พืชที่มีความต้านทานหรือมีความทนทานต่อโรค การใช้วิธีการด้านเกษตรกรรม รวมทั้งการใช้วิธีการป้องกันควบคุมโรคด้วยวิธีการชีวภาพ (biological control) เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) จุลินทรีย์ชนิดที่สามารถใช้เพื่อการควบคุมป้องกันกำจัดโรคพืช ได้แก่ เชื้อราแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีต (Actinomycetes) เป็นต้น การใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้สามารถควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นไปอย่างต่อเนื่องในระยะยาว นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตรและสภาพแวดล้อม

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายในการเป็นทางเลือกของการแก้ปัญหาโรคที่สำคัญของมันฝรั่ง โดยการคัดกรองและเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เพื่อใช้ในการควบคุมกำจัดโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งและพืชในกลุ่มของมะเขือเทศ โดยการมุ่งเน้นการศึกษาแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งมีอยู่ในแปลงปลูกมันฝรั่งในสภาพธรรมชาติจากแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย ทดสอบความสามารถในการยับยั้งและ/หรือควบคุมการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล (early blight) ของมันฝรั่งทั้งในห้องปฏิบัติการ การทดสอบนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ผลดี มาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและในแปลงทดลองในสภาพธรรมชาติ ตลอดจนการศึกษาแนวทางในการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสำหรับเกษตรกรต่อไป

วัตถุประสงค์

1. แยกเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะจากดินและผิวใบมันฝรั่งจากแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศเพื่อการใช้เป็นจุลินทรีย์ในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดสีน้ำตาล (early blight) ของมันฝรั่งและพืชในตระกูลมะเขือเทศ (Family Solanaceae)
2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ และสารสารทุติยภูมิ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ และการควบคุมโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และในสภาพแปลงปลูก
3. พัฒนาแบคทีเรียปฏิชีวนะในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งและพืชในตระกูลมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer
4. ศึกษากลไกการทำลายราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer โดยแบคทีเรียปฏิชีวนะด้วย scanning electron microscope (SEM)

การตรวจเอกสาร

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) มีถิ่นกำเนิดทางแถบที่ราบสูงของเทือกเขาแอนดีสในอเมริกาใต้ บริเวณประเทศเปรู ซึ่งมีการปลูกมันฝรั่ง และนำมาบริโภคเป็นอาหารหลักเป็นเวลา ช้านาน มันฝรั่งมีบทบาทต่อชาวตะวันตกในศตวรรษที่ 18 โดยกลายเป็นอาหารหลักในประเทศไอร์แลนด์ และได้แพร่หลายไปยังในยุโรปอื่นๆ รวมทั้งอเมริกาเหนือ แอฟริกา และเอเชีย ในประเทศไทยมีการปลูก มันฝรั่งในพื้นที่ภาคเหนือ เช่น จังหวัดตาก เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง และจังหวัดพะเยา โดยมีการปลูกมันฝรั่งในช่วงต้นฤดูหนาว คือเดือนพฤศจิกายนหรือต้นเดือนธันวาคม (กรมวิชาการเกษตร, 2541)

โดยทั่วไปแล้วมันฝรั่งเป็นพืชที่ปลูกง่ายและเจริญเติบโตได้ดี ในสภาพดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม การปลูกมันฝรั่งมักพบปัญหาศัตรูพืชรบกวน ตั้งแต่ระยะเริ่มปลูกไปจนถึงระยะการเก็บเกี่ยวและการรักษาผลผลิต โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากรา โรคที่สำคัญได้แก่ โรคใบไหม้ สาเหตุเกิดจากรา *Phytophthora infestans* โรคใบจุดสีน้ำตาล สาเหตุเกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer โรคโคนเน่าและแผลสะเก็ดดำ สาเหตุเกิดจากรา *Rhizoctonia solani* โรคเหี่ยวและหัวเน่า สาเหตุเกิดจากรา *Fusarium* spp. และโรคเน่าต้นเหี่ยวตาย สาเหตุเกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคเหี่ยว สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* และโรคเน่าละ สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* รวมถึง โรคของ มันฝรั่งที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (กรมวิชาการเกษตร, 2541)

โรคใบจุดสีน้ำตาล (Early blight)

โรคใบจุดสีน้ำตาลที่พบในมันฝรั่ง เป็นโรคที่ระบาดแพร่หลายในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง สาเหตุเกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชในตระกูล Solanaceae ได้หลายชนิด เช่น มะเขือเทศ และมะเขือยาว (Holliday, 1980) อาการของโรคปรากฏได้ทั้งบนใบ ลำต้น และหัวมันฝรั่งที่อยู่ในดิน แผลที่พบบนใบจะมีลักษณะเป็นจุดกลมหรือเป็นเหลี่ยม สีน้ำตาลเข้มจนถึงดำมีขนาดตั้งแต่ 2-4 มิลลิเมตร ไปจนถึงเส้นผ่าศูนย์กลางครึ่งนิ้ว (ภาพที่ 1) เมื่อจุดขยายใหญ่ขึ้นมักพบลักษณะแผลเป็นวงซ้อนกัน โดยมีจุดศูนย์กลางร่วมกัน หรือที่เรียกว่า concentric rings หรือ target spot แผลมักถูกจำกัดโดยเส้นใบ และเมื่อแผลมีจำนวนมากขึ้นอาจขยายใหญ่ลาม



ก



ข

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในแปลงปลูกของเกษตรกร
 ก อาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในแปลงปลูก
 ข อาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลบนใบมันฝรั่ง

ติดกัน ทำให้ใบเหลือง และแห้งตายในที่สุด อาการมักเกิดกับใบส่วนล่างก่อน และพัฒนาขึ้นสู่ใบที่อยู่ด้านบน อาการบนลำต้นสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต แผลมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็ก สีดำ ขยายขนาดไปตามความสูงของลำต้น อาการที่หัวจะเป็นจุดสีน้ำตาล ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อากาศร้อน ความชื้นสูง จะทำให้มันฝรั่งอ่อนแอต่อโรคนี้อันและพืชจะแห้งตายก่อนกำหนด (Hooker, 1981)

ลักษณะของราสาเหตุ

รา *Alternaria solani* Sorauer (syn. *Macrosporium solani* Ellis & Martin) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) มีสีเทาเข้ม ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บางสายพันธุ์สามารถสร้าง pigment สีเหลือง conidia สีน้ำตาลอ่อน เกิดเดี่ยวๆ ลักษณะตรงหรือโค้งงอ เล็กน้อย รูปไข่ ขนาด 15-19 x 150-300 μm มีผนังกัน 6-9 อัน ส่วนหางยาว ลักษณะโค้งงอ สีส่อนกว่าสปอร์ ก้านชูสปอร์ (conidiophore) เกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม ลักษณะตรง หรือ โค้งงอ เล็กน้อยสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 2) ขนาดกว้าง 6-10 μm และยาวได้ถึง 100 μm (Hooker, 1981)



ภาพที่ 2 รูปร่างลักษณะของสปอร์ของรา *Alternaria solani* Sorauer

วงจรของโรค

เส้นใยและสปอร์ของรา *Alternaria solani* Sorauer สามารถมีชีวิตอยู่บนซากใบพืชที่ตกค้างอยู่ในดิน บนหัวมันฝรั่งหรือพืชอื่นในสกุล *Solanum* ได้นานถึง 1 ปี หรือมากกว่า (Thomma, 2003) สปอร์ของเชื้อราสาเหตุจะสร้าง infection peg แทะเข้าสู่ผิวพืชโดยตรง บริเวณใบแก่ที่อยู่ด้านล่าง อาการจะเริ่มปรากฏภายหลังระยะดอกบานไปจนถึงมันฝรั่งเริ่มลงหัวจะปรากฏอาการที่ใบมากขึ้น ในช่วงฤดูปลูกราสาเหตุจะสร้างสปอร์จำนวนมากบนแผลที่ต้น กิ่ง และใบ โดยสามารถเจริญอยู่บนเศษซากพืชที่ปล่อยทิ้งไว้ในแปลงปลูก บางส่วนอาจอาจไปอาศัยพืชอาศัยบางชนิดเมื่อปลูกพืชใหม่ก็จะกลับมาก่อให้เกิดโรคได้อีก (Hooker, 1981)

การป้องกันกำจัดโรค

ปรับปรุงสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของมันฝรั่งตลอดฤดูปลูก เช่น การใส่ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมักเพื่อปรับปรุงบำรุงดิน นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มอัตราของปุ๋ยไนโตรเจนสามารถ ลดการเกิดโรค และยังช่วยให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Blachinski *et al*, 1996) ภายหลังจากเก็บเกี่ยวหัวมันฝรั่งแล้ว ควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกไปให้หมดโดยการฝังดินลึกๆ หรือเผาทำลายในแปลงปลูกที่มีอาการของโรคระบาด ได้มีการใช้สารเคมี เช่น chlorothalonil, maneb, benomyl, captafol และ mancozeb (Agrios, 1988) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้สารบางชนิดกระตุ้นความต้านทานของพืช Coquoz *et al*. (1995) รายงานการใช้ arachidonic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวกระตุ้นให้พืชสร้าง salicylic acid ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องในการทำให้เกิดความต้านทานแบบแพร่กระจาย (systemic acquired resistance) ต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ พบว่าต้นมันฝรั่งที่ฉีดพ่นด้วย arachidonic acid สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของรา *Phytophthora infestans* และ *Alternaria solani* Sorauer

การศึกษาค้นคว้าควบคุมโดยชีววิธี มีรายงานการศึกษาโดย Sharga and Lyon (1998) รายงานการใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BS107 ในชีวิตผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำและ (bacterial soft rot) ของมันฝรั่งในประเทศแคนาดา Kempe and Sequiera (1983) รายงานการใช้แบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* strain FU-6 และ *Pseudomonas fluorescens* ในการชักนำให้ต้นมันฝรั่งที่ปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา ต้านทานต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*) สาเหตุโรคเหี่ยว (bacterial wilt) นอกจากนี้ Beagle-Ristaino and Papavizas (1985)

รายงานการใช้รา *Verticillium biguttatum*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*, *Gliocladium virens*, binucleate *Rhizoctonia*, fluorescent pseudomonad และ *Bacillus* sp. ร่วมกับการคลุกหัวมันฝรั่งในแปลงปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อควบคุมรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรค *Rhizoctonia* Black Scurf ในประเทศไทย มีผู้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคของ มันฝรั่ง โดย Sanyong (1992) ได้แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากใบมันฝรั่งในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 82 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งการเจริญของรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมันฝรั่งในห้องปฏิบัติการ พบแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุได้ดี การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี chlorothalonil พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 3 ไอโซเลท สามารถควบคุมโรคได้ดีได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี

ถึงแม้ว่าการป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้สารเคมี เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว สามารถลดการแพร่กระจายของโรคที่เกิดขึ้นรุนแรงขึ้นมาเป็นครั้งคราวได้ แต่การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่องได้สร้างปัญหาและก่อให้เกิดผลกระทบต่าง ๆ เป็นอย่างมาก ได้แก่ ปัญหาทางเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง โรคและแมลงศัตรูพืชต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่มีผลกระทบต่อผู้บริโภค และปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม ซึ่งหลายประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา และกลุ่มประเทศในยุโรปได้เริ่มกำหนดนโยบายการลดปริมาณการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชลงขณะเดียวกันได้พยายามแสวงหาวิธีการควบคุมศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีหรือหาสิ่งทดแทน เพื่อให้มีการใช้สารเคมีลดลง ดังนั้นการแก้ไขหรือลดปัญหาต่าง ๆ จากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช สามารถกระทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) (จิระเดช, 2534)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control) หมายถึง การลดปริมาณของเชื้อสาเหตุ (inoculum) หรือการลดปฏิริยาการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุที่อยู่ในระยะที่มีปฏิริยาหรือระยะพักตัว โดยการใช้จุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง หรือมากกว่า 1 ชนิด ให้บรรลุผลสำเร็จในสภาพธรรมชาติหรือด้วยการจัดการสภาพแวดล้อมของพืชอาศัย หรือใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Baker and Cook, 1974)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคพืช (plant pathogen) มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ แต่ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าว อาจผันแปรไปตามแหล่งและสถานที่ซึ่งต่างกัน รวมทั้งสภาวะอากาศ ที่แตกต่างกันในแต่ละปี โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคสามารถหาได้จากบริเวณซึ่งเคยมีโรคระบาดจากโรคใดโรคหนึ่ง แต่ต่อมาไม่พบการระบาดของโรคนั้น หรือพบว่ามีการระบาดลดลงทั้งๆ ที่มีการปลูกพืชอาศัยที่อ่อนแอ (susceptible host plants) ก็ไม่พบการเกิดโรค จากข้อสังเกตดังกล่าวนี้ จึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความผันแปรของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคในแหล่งปลูกพืชแต่ละแห่ง การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เริ่มจากการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีโรคระบาด จากพืชที่เป็นโรคหรือจากดินที่มีคุณสมบัติทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี และมีความต้านทานโรค จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช มีการเจริญได้ตัวอย่างรวดเร็ว และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีรายงานการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้แก่ ราปฏิปักษ์ เช่น *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp., *Gliocladium* spp. และ *Talaromyces flavus* (teleomorph of *Penicillium* sp.) แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Streptomyces* sp. (Gnanamanickam, 2002)

แบคทีเรียปฏิปักษ์กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช มีรายงานการศึกษามาก ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดย Fravel and Spurr (1971) ได้แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากใบยาสูบ พบแบคทีเรีย *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของรา *Alternaria alternata* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ถึง 88% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม Broadbent *et al.* (1977) รายงานว่ามี *Bacillus* spp. หลาย strain ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิต endospore ที่ทนต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้ เช่น *B. subtilis* A₁₃ ซึ่งแยกได้จาก เส้นใยของรา *Sclerotium rolfsii* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช หลายชนิดและ มีความสามารถในการเจริญครอบคลุมบริเวณรากพืชทั้งในสภาพแปลงปลูกและสภาพห้องปฏิบัติการ Mathre *et al.* (1999) รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas aureofaciens* AB254 ในการควบคุมโรคเน่าของต้นกล้าข้าวโพดในประเทศแคนาดา โดยการคลุกเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูกด้วยแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าให้ผลดีในการควบคุมเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี Metalaxyl นอกจากนี้ Fiddaman *et al.* (2000) รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมรา *Botrytis cinerea* และ *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคของผักกาดหอมในประเทศอังกฤษ สามารถควบคุมโรคได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมี Rovral WP.

Collin and Jacobsen (2003) ได้มีรายงานการใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมรา *Cercospora beticola* สาเหตุโรคใบจุดของ sugar beet ในสภาพแปลงทดลองในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ Viji *et al.* (2003) ได้แยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายดอกเห็ดในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้จำนวน 849 ไอโซเลท พบว่า 32 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคใบจุดสีเทาของ ryegrass และ 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*, *Sclerotinia homoeocarpa* และ *Fusarium culmorum* และจากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทคือ *Pseudomonas aeruginosa*

ในประเทศไทย มีผู้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช เช่น จิระเดช (2531) ได้ทำการทดลองโดยใช้รา *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium virens* แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของรา *Pythium aphanidermatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง หลังจากนั้นทดลองใช้ *T. harzianum* และ *G. virens* สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพดีมาควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน พบว่าราปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถควบคุมโรคได้ผลดี และได้พบว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อรา *T. harzianum* สามารถป้องกันการเกิดโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากรา *P. aphanidermatum* ได้ เกษม (2538) ได้ทำการวิจัยเพื่อหาเทคนิคในการผลิตคีโตไมยมควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการใช้สายพันธุ์ *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* มาพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผงและเม็ด พบว่าสปอร์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลามากกว่า 3 ปี ในสภาพความชื้นไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่เกิดจากรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* และโรคโคนเน่าของข้าวโพดหวานที่เกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* ในสภาพแวดล้อมแตกต่างกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก พบว่าสามารถควบคุมโรคดังกล่าวได้เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา pentachloronitrobenzene นอกจากนี้ Gesnara (1994) ศึกษาถึงการควบคุมโรคของมะเขือเทศ และ ข้าวบาเลย์ที่เกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* โดยการคลุกเมล็ดข้าวบาเลย์ด้วยผง *T. harzianum* ในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดรา *S. rolfsii* ได้มากกว่าการคลุกในอัตรา 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพของ *T. harzianum* โดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV พบว่าสายพันธุ์ M23 และ M4 สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติม benomyl และทำให้รา *S. rolfsii* มีการเจริญของเส้นใยและการสร้าง sclerotia ลดลงบนอาหาร PDA โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถลดการเกิดโรค stem rot ของมะเขือเทศ และโรค seedling blight ของข้าวบาเลย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์เดิม มานะ และคณะ (2543) ได้แยกราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จาก

ดินป่าและดินเกษตรกรรมในภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 183 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกทุกสายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุ โรคพืชที่สำคัญทางภาคใต้ 3 ชนิดคือ รา *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *S. rolfsii* พบว่าสายพันธุ์ต่างๆ ของราปฏิปักษ์ในดินเกษตรกรรมมีประสิทธิภาพดีกว่า *Trichoderma* ในดินป่า โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีได้แก่ *T. harzianum*, *T. viride* และ *G. virens* นอกจากนี้ นิพนธ์ (2533) กล่าวว่า ความสำเร็จในการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปใช้ควบคุมโรคที่เกิดกับส่วนเหนือดินของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย หรือรายังมีความจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดต่างๆ เพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค โดยเฉพาะนิเวศวิทยาของเชื้อ และปฏิกริยาร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิดบนพืช จะช่วยให้ทราบกลไกโดยละเอียดของการควบคุมโรค และสามารถนำมาปรับใช้ให้เกิดประสิทธิภาพได้สูงสุด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีควรเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนผิวใบพืชหรือครอบคลุมส่วนต่างๆ ของโรคพืชได้ดีทุกสภาพอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทนสภาพอากาศแห้ง หรือแสงแดดได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ควรมีคุณสมบัติที่ทนต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นในธรรมชาติได้ดี หรือมีความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในธรรมชาติได้ดี ตลอดจนทนต่อสภาพการใช้สารเคมีในทางการเกษตรได้ดีอีกด้วย

กลไกการควบคุมโรคโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

การแข่งขัน (competition) แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในด้านการครอบครองพื้นที่ และการใช้ธาตุอาหาร ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต การแข่งขันที่พบมากคือการใช้ธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช เช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก (Iron, Fe^{+3}) ในธรรมชาติได้ดีกว่ารา *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี (Weller *et al*, 2002)

การเป็นปรสิต (Parasitism) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์เข้าไปเจริญอาศัยทำลายเชื้อสาเหตุโรค เช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983)

การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) แบคทีเรียปฏิปักษ์หลายชนิดมีความสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรก เกิดจากกลไกชนิดนี้คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 สร้างสารปฏิชีวนะ bacteriocin ชื่อการค้า agrocin 84 ทำลายแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สาเหตุโรค crown gall ขององุ่น (Thomson, 1987) นอกจากนี้ Peng and Mustafa (2003) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin, mycosubtilin และ mycobacillin รวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์ subtilin และ levansucrase ในการยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* และ *Pythium ultimum*

การชักนำให้พืชต้านทานต่อโรค (Induced resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย มีรายงานว่านอกจากแบคทีเรียปฏิปักษ์จะควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แล้ว ยังสามารถที่จะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณราก ทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Silva *et al.* (2004) รายงานการใช้แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *tomato* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของมะเขือเทศ 5 ชนิด ได้แก่ *A. solani* สาเหตุโรค early blight, *Corynespora cassiicola* สาเหตุโรค foliar blight, *Oidium lycopersici* สาเหตุโรค powdery mildew, *Stemphiliium solani* สาเหตุโรค leaf spot และ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรค bacterial spot ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองโดยการชักนำให้พืชสร้างสาร lipoxygenase, phenylalanine ammonia-lyase และ peroxidase

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) แบคทีเรียปฏิปักษ์นอกจากจะควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชและชักนำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคแล้ว แบคทีเรียปฏิปักษ์บางชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย Kurek and Jaroszuk-Seisel (2003) รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 23 และ 45 ในการควบคุมรา *F. culmorum* สาเหตุโรคเหี่ยว (vascular wilt) ของข้าวไรน์ โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างสาร siderophore ยับยั้งการเจริญของรา *F. culmorum* ได้ และพบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับไนเตรท (NO_3^-) และแอมโมเนีย (NH_4^+) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ Kilian *et al.* (2003) รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่พัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ทางการค้าชื่อ FZB24 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต

ของพืช โดยการใช้ชีวผลิตภัณฑ์ ตลอดจนร่วมกับการปลูกหัวมันฝรั่ง พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และการฉีดพ่นชีวผลิตภัณฑ์ที่ใบมันฝรั่ง สามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 8.7 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกராสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

เก็บตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบจุดสีน้ำตาล จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก แยกเชื้อ (isolate) โดยวิธี tissue transplanting โดยตัดแผลบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติ ให้มีขนาด ประมาณ 3x3 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นพืชไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวันประมาณ 30°C กลางคืน 25°C) บ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเส้นใยของราเจริญออกมาจากชิ้นพืช ใช้เข็มเย็บเย็บแยกทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี hyphal tip isolation โดยย้ายมาใส่ใน PDA slant (ยอคซาบ, 2544) จากนั้นศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ และศึกษารูปร่างลักษณะและการเกิดของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำสปอร์มา ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) เก็บรักษาเชื้อราบนอาหาร PDA slant เพื่อเป็น stock culture ไว้ใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

2. การแยกแบคทีเรียปฏิบั้กษจากดิน และใบมันฝรั่ง

การแยกแบคทีเรียปฏิบั้กษจากดิน

นำดินบริเวณแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก บริเวณเดียวกับการเก็บตัวอย่างดินในข้อ 1 นำมาแยกแบคทีเรียโดยวิธี soil dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NA (Nutrient agar) โดยทำการเจือจางสารละลาย ดินที่ระดับความเข้มข้น 10^5 10^6 และ 10^7 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยจะปรากฏโคโลนีของ เชื้อ 10-30 โคโลนี ใน 1 plate จากนั้นใช้ micropipette คูดสารละลายดินในแต่ละความเข้มข้นๆ ละ 1 มิลลิตร ผสมในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มี PDA และ NA ความเข้มข้น ละ 5 จาน นำจานอาหารไปบ่มเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (กลางวัน 30°C และกลางคืน 25°C) เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย จากโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันแล้วนำมา เลี้ยงบนอาหาร NA ในจานเลี้ยงเชื้อ (ยอคซาบ, 2544) จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้จาก ไอโซเลท ต่างๆ มาเก็บรักษาบนอาหาร NA slant เป็น stock culture ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4-7°C เพื่อทดสอบ ประสิทธิภาพต่อไป

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากไขมันฝรั่ง

นำไขมันฝรั่งบริเวณแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก บริเวณเดียวกับการเก็บตัวอย่างดินในข้อ 1 และ 2 นำมาแยกแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนผิวใบของมันฝรั่ง (phyllosphere bacteria) โดยวิธี dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NA โดยนำน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (sterile distill water) ที่ล้างไขมันฝรั่ง มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} จนถึง 10^{-7} ในการทดสอบเบื้องต้นคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 10^4 10^5 และ 10^6 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยจะปรากฏ โคลินีของแบคทีเรียสำหรับนำไปใช้แยกโคลินีเดี่ยว (single colony) จากนั้นใช้ micropipette คูดเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย แต่ละความเข้มข้นๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ความเข้มข้นละ 5 จาน นำจานอาหารไปบ่มเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ทำการแยกโคลินีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย จากโคลินีที่มีลักษณะต่างกันแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ มาเก็บรักษาบนอาหาร NA slant เพื่อใช้เป็น stock culture เก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $4-7^{\circ}\text{C}$ เพื่อไว้ศึกษาต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

นำราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล คือ *A. solani* ที่เจริญบน PDA อายุ 7 วัน มาทดสอบโดยการ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณรอบนอกของโคลินีของราออกเป็นชิ้นเชื้อกลมๆ (culture disc) จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นราสาเหตุโรคพืช วางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้เป็นเวลา 2 วัน จึงย้ายแบคทีเรียโดยใช้เข็มเขี่ยแต่ละเซลล์ของแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง มาวาง 4 จุด บนอาหารที่เลี้ยงเชื้อที่มีราสาเหตุโรคพืชเจริญอยู่ตรงกลาง โดยวางแบคทีเรีย 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท (วราภรณ์, 2545) ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่ 28°C วัดความกว้างของโคลินีของราสาเหตุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ ยับยั้งการเจริญ} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

โดย R1= เส้นผ่าศูนย์กลางโคลินีของราในชุดควบคุม
R2= เส้นผ่าศูนย์กลางโคลินีของราในจานเลี้ยงเชื้อร่วม

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการละลายฟอสเฟต

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลทที่มีแนวโน้มดีในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 22 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya agar ที่ประกอบด้วย $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5% ในจานเลี้ยงเชื้อ (ธงชัย, 2546) ปลูกเชื้อแบคทีเรียบริเวณกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดความกว้างของ clear zone ภายหลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลทที่มีแนวโน้มดีในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 22 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar ที่ประกอบด้วย Skim imlk 0.2% ในจานเลี้ยงเชื้อ (ศุภรัตน์ และคณะ, 2548) ปลูกเชื้อแบคทีเรียบริเวณกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดความกว้างของ clear zone ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

6. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลทที่มีแนวโน้มดีในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 22 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar ที่ประกอบด้วย Tributyrin 1% ในจานเลี้ยงเชื้อ ปลูกเชื้อแบคทีเรียบริเวณกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (อรอนงค์ และคณะ, 2549) ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดความกว้างของ clear zone ภายหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลทที่มีแนวโน้มดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 22 ไอโซเลท โดยแยกเลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะ แต่ละไอโซเลทในอาหาร Saboraud glucose broth (SGB) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง นำ suspension ที่ได้จากการเลี้ยง มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่

ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C ระยะเวลา 30 นาที (ดัดแปลงจากวิธีการของ Fiddaman and Rossall, 1993) นำสารละลายที่ได้มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ความเข้มข้นของสารละลาย 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% และ 5% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benomyl ในอัตรา 35 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เทส่วนผสมที่ได้ แต่ละความเข้มข้นในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณรอบนอกของโคโลนีของราสาเหตุออกเป็นชั้นเชื้อกลมๆ จากนั้นใช้เข็มเย็บย้ายชั้นราสาเหตุโรคพีช วางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเข้มข้น ในแต่ละกรรมวิธี ทำ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดความกว้างของโคโลนีของราสาเหตุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control)

8. การพัฒนาแบคทีเรียปฏิชีวนะในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 2 ไอโซเลท โดยเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient Broth) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารพา (carrier) 4 ชนิด คือ dolomite, talcum power, hyflo supercell และ diatomaceous earth จำนวนชนิดละ 2,000 กรัม สำหรับแบคทีเรียปฏิชีวนะ 2 ไอโซเลท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงไว้ 120 มิลลิลิตรต่อสารพาแต่ละชนิด จำนวน 1,000 กรัม ผสมให้เข้ากันและนำไปตากให้แห้งในที่ร่ม แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความละเอียด (ดัดแปลงจากวิธีการของ วราภรณ์, 2545) ตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อที่อยู่ในผงเชื้อ โดยการทำให้ serial dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เจริญได้บนผิวหน้าวุ้นอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ โดยกำหนดจะทำการตรวจความมีชีวิตของเชื้อในผลิตภัณฑ์ชีวภาพทุกๆ 3 เดือน เป็นเวลา 1 ปี

9. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบั้กษาในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

การเตรียมวัสดุปลูกและการปลูกมะเขือเทศ

นำวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน แกลบ ปุ๋ยหมัก ในอัตรา 5 : 1 : 1 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงบรรจุลงในกระถางที่สะอาด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 150 กระถาง โดยใส่ดินประมาณ $\frac{3}{4}$ ของกระถาง นำต้นกล้ามะเขือเทศปลูกลงในกระถางที่เตรียมไว้กระถางละ 1 ต้น หลังปลูกทำการให้น้ำแก่ต้นมะเขือเทศทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง ในปริมาณที่สม่ำเสมอ ใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 กระถางละประมาณ 1 ช้อนชา หลังจากปลูกได้ 4 สัปดาห์ ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงเป็นบางครั้ง เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของหนอนชอนใบ เพลี้ยอ่อน และเพลี้ยไฟ สารฆ่าแมลงที่ใช้คือ methomyl (ชื่อการค้าคือ แลนเนท) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร และสารสกัดจากสะเดา ความเข้มข้น 0.5 มล./น้ำ 1 ลิตร พ่นสลับกัน เมื่อพบการระบาดของ

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของรา *Alternaria solani* Sorauer

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกระตุ้น (induced) ให้ราสร้างสปอร์โดยใช้แผ่นสไลด์ชุบเส้นใยที่ผิวหน้าวุ้นอาหารออก ล้างเส้นใยที่ค้างอยู่บนวุ้นอาหาร โดยแช่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) นำมาคว่ำซ้อนกันในถาดที่สะอาด หลังจากนั้น 2 วัน จึงใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเทลงในจานอาหารประมาณ 15 มิลลิลิตร ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออก (ไกรวุฒิ, 2544) แล้วนำ suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วย haemocytometer ก่อนนำไปฉีดพ่นต้นมันฝรั่ง



ภาพที่ 3 การชักนำการสร้างสปอร์ของรา *Alternaria solani* Sorauer

การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 2 ไอโซเลท โดยเลี้ยงในอาหาร NB เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยและปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml (สปอร์/มิลลิลิตร)

การเตรียมสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีแนวโน้มดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล จำนวน 2 ไอโซเลท โดยแยกเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่ละไอโซเลทในอาหาร SGB ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง นำ suspension ที่ได้จากการเลี้ยง มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C ระยะเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ผสมน้ำเพื่อทำการเจือปนในความเข้มข้นของสารละลาย 10%

การเตรียมสารกำจัดเชื้อราชื่อการค้า Benlate (benomyl)

นำสารกำจัดเชื้อรา benomyl (ชื่อการค้า Benlate) มาเตรียมเป็นสารละลายแขวนลอยโดยใช้ อัตรากลางที่ระบุไว้บนฉลาก อัตราที่บริษัทแนะนำคือ 30-40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราที่ใช้คือ 35 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร

การทดลองในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ทำการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ ชีวภัณฑ์ และสารเคมี ที่ได้เตรียมไว้ ลงบนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร/ต้น ภายหลังจากการพ่น ได้ 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ ที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบน ต้นมะเขือเทศ การฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์และราสาเหตุ พยายามให้ทั่วถึงโดยฉีดทั้งทางด้านบน และด้านข้างของต้นมะเขือเทศอย่างสม่ำเสมอโดยให้หัวฉีดห่างจากต้นประมาณ 1 ฟุต ปรับ สภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดโรคโดยรักษาความชื้นให้พอเหมาะ (ภาพที่ 4) โดยการพ่น ฝอยน้ำเข้าเย็น และทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ชีวภัณฑ์และสารเคมี หลัง การปลูกเชื้อทุก 5 วัน รวม 4 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ทำการ ทดลอง 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น ประกอบด้วยคำรับการทดลองดังนี้

คำรับการทดลอง

1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (control)
2. ชุดควบคุมปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว
3. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
4. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044
5. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
6. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
7. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044

8. ปลุกเชื้อราสาเหตุและนิต์ปนผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
9. ปลุกเชื้อราสาเหตุและนิต์ปนสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
10. ปลุกเชื้อราสาเหตุและนิต์ปนสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044
11. ปลุกเชื้อราสาเหตุและนิต์ปนสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
12. ปลุกเชื้อราสาเหตุและนิต์ปนสารเคมีกำจัดรา benomyl



ภาพที่ 4 การคลุมต้นพืชทดลองด้วยแผ่นพลาสติกเพื่อให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรคหลังจากการปลุกเชื้อ

10. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงปลูกมันฝรั่ง

เตรียมแปลงปลูกมันฝรั่งโดยใช้แปลงทดลองของ บริษัท มหาราชการเกษตร จำกัด ตำบลทุ่งสะโตก อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยการใส่ปุ๋ยหมักในอัตรา 500 กิโลกรัม/ไร่ ผสม

คลุกเคล้ากับดินให้ทั่ว ทำการยกแปลงแบบแถวเดี่ยวร่อง โดยการขุดร่องให้สูงขึ้นมาและปลูกหัว
พันธุ์บนสันร่อง ความยาวของร่อง 5 เมตร ระยะระหว่างคัน 30 เซนติเมตร ขุดหลุมลึก 10
เซนติเมตร การปลูกจะทำการปลูกทั้งหัว และใช้ฟางข้าวเป็นวัสดุคลุมแปลงปลูก มีการให้น้ำแบบ
พ่นฝอย (Springkler) วันละ 1 ครั้ง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แปลงปลูกมันฝรั่งทดลอง บริษัท มหาราชการเกษตร จำกัด ตำบลทุ่งสะโตก
อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

การฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะในแปลงปลูก

ทำการเตรียมแบคทีเรียปฏิชีวนะ ชีวผลิตภัณฑ์ สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิชีวนะ และ
สารเคมี วิธีการเดียวกันการฉีดพ่นในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองโดยทำการฉีดพ่นในสภาพแปลง
เมื่อมันฝรั่งมีอายุได้ 1 เดือน (ภาพที่ 6) ทำการฉีดพ่นทุกสัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง โดยวางแผนการ
ทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ
โดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น ประกอบด้วยตำรับ
การทดลองดังนี้

ตำรับการทดลอง

1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (control)

2. ชุดควบคุมปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว
3. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
4. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044
5. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
6. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
7. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044
8. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
9. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026
10. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044
11. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044
12. ปลูกเชื้อราสาเหตุและนิตพ่นสารเคมีกำจัดรา benomyl



ภาพที่ 6 การนิตพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชในแปลงทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และการประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยแบ่งออกเป็น

การหาปริมาณของโรค (disease intensity) โดยการนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้น แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากจำนวนต้นทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี

การประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้นในแต่ละการทดลอง โดยแบ่งปริมาณของโรคเป็น 11 ระดับ คือ 0-10 โดยที่ 0 = ใบที่ไม่มีอาการของโรค และ 10 = พื้นที่ใบที่เป็นโรค 100% รวมถึงอาการใบร่วงที่เกิดจากโรคด้วย นำค่าที่ได้จากการประมาณของโรคมาแปลงเป็นค่า ความเสียหายของพืช (crop loss assessment) การประเมินความเสียหาย กระทำโดยการนำผลที่ได้จากการหาปริมาณของโรคมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย หรือดัชนีการเข้าทำลาย (สปีคคี้, 2540)

$$\% \text{ ดัชนีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่มวัด}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของระดับความรุนแรง}}$$

11. การศึกษากลไกการทำลายราสาเหตุบนผิวใบมันฝรั่งโดยใช้ scanning electron microscope (SEM)

นำใบมันฝรั่งที่ได้จากการทดลองในแปลงปลูกอายุ 3 สัปดาห์หลังปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ มาตรวจดูกลไกการทำลายบนผิวใบโดยใช้กล้อง SEM ของอาคารวิจัยและปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยมีวิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาดังนี้

ตัดชิ้นเนื้อเยื่อใบพืชบริเวณที่มีอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล ทำการคงสภาพเนื้อเยื่อโดยการตรึงด้วย glutaraldehyde 2.5% ใน sodium phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย sodium phosphate buffer pH 7.2 0.1M 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที นำไปตรึงด้วย Osmium tetroxide 1% ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol 30, 50, 70, 100, 100, 100 % ขึ้นตอนละ 15 นาทีตามลำดับ ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer (HITACHI รุ่น HCP-2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ติดบนแท่นวาง

ตัวอย่างสำหรับดูด้วย SEM นำไปเคลือบทองคำด้วยเครื่อง Ion coater (ยี่ห้อ EikoEngineer รุ่น IB-2) เป็นเวลา 5 นาที นำเข้าไปดูด้วยSEM (ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM 5600 LV) (รุจิพร, 2541)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ
2. ห้องปฏิบัติการแผนกวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ บริษัท ปุ๋ยไบโอเน็ค จำกัด โรงงานสุราแสงโสม อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
3. แปลงปลูกมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง บริษัท มหาราชธุการเกษตร จำกัด ตำบลทุ่งสะโตก อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือนตุลาคม 2547 ถึงเดือน ธันวาคม 2549

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อหาแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในห้องทดลอง เรือนปลูกพืชทดลอง และในแปลงเกษตรกร
2. การพัฒนาแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับการควบคุมโรคพืช เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีทางการเกษตรต่อไป

ผลและวิจารณ์

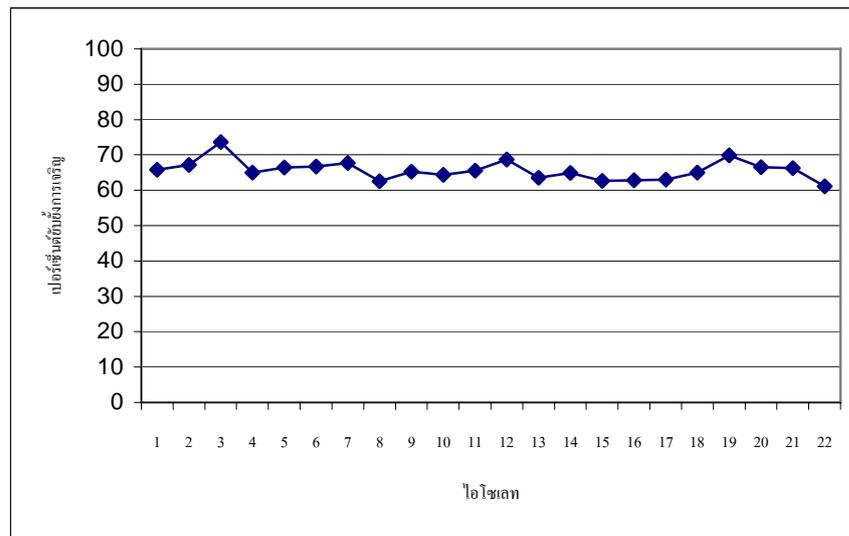
ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียจากดิน และไขมันฝรั่ง

การแยกแบคทีเรียจากดินและผิวใบ บริเวณแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในพื้นที่ 6 จังหวัดในภาคเหนือประกอบด้วย จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี dilution plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) และ NA (nutrient agar) โดยทำการเจือจางสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) โดยพบว่า มีเพียงแบคทีเรียที่เจริญจากการย้ายเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันได้แบคทีเรียจำนวน 509 ไอโซเลท

2. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

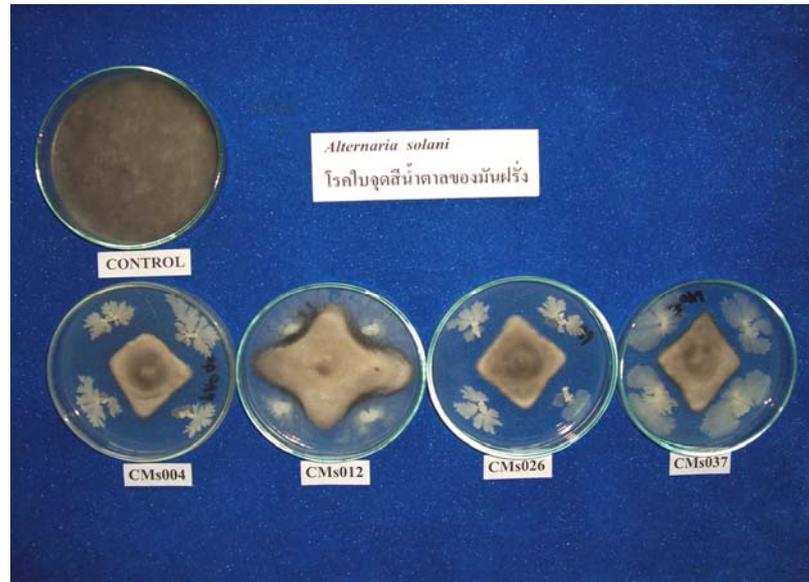
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer พบว่าแบคทีเรียทั้ง 509 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ดีแตกต่างกัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุ พบไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุด 22 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุสูงที่สุด 2 ไอโซเลทคือ CMs026 และ PAOs044 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคได้ 73.67 % และ 70.65 % ตามลำดับ (ภาพที่ 7 ภาพที่ 8 ภาพที่ 9 และ ภาพที่ 10)



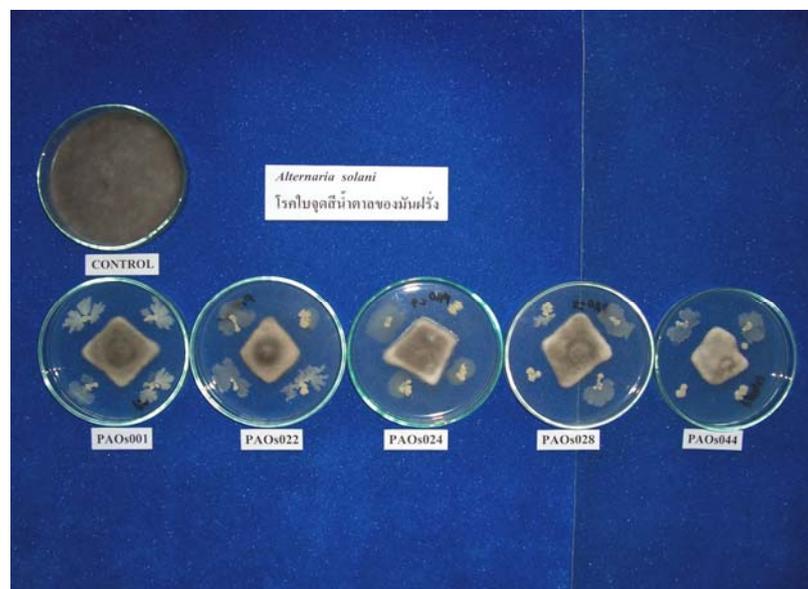
ภาพที่ 7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



ภาพที่ 8 แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



ภาพที่ 9 แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs004, CMs012, CMs026 และ CMs037 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



ภาพที่ 10 แบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs001, PAOs022, PAOs024, PAOs028 และ PAOs044 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

3. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการละลายฟอสเฟต

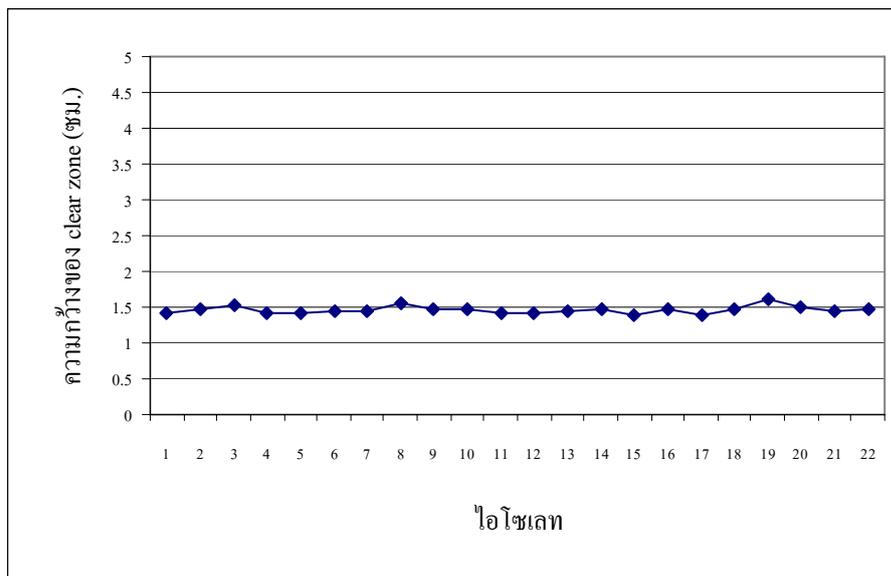
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการละลายฟอสเฟต โดยการผสม $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovakaya agar พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 22 ไอโซเลท สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีแตกต่างกัน โดยมีความกว้างของ clear zone ขนาดแตกต่างกัน ไอโซเลทที่ให้ ความกว้างของ clear zone มากที่สุดคือ ไอโซเลท PAOs044 โดยมีความกว้างเท่ากับ 1.60 เซนติเมตร ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน (ภาพที่ 11 และภาพที่ 12)

4. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการย่อยสลายโปรตีน

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในย่อยสลายโปรตีน โดยการผสม Skim milk 0.2 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 22 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ดีแตกต่างกัน โดยมีความกว้างของ clear zone ขนาดแตกต่างกัน ไอโซเลทที่ให้ ความกว้างของ clear zone มากที่สุดคือ ไอโซเลท PAOs044 โดยมีความกว้างเท่ากับ 6.24 เซนติเมตร ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน (ภาพที่ 13 และภาพที่ 14)

5. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการย่อยสลายไขมัน

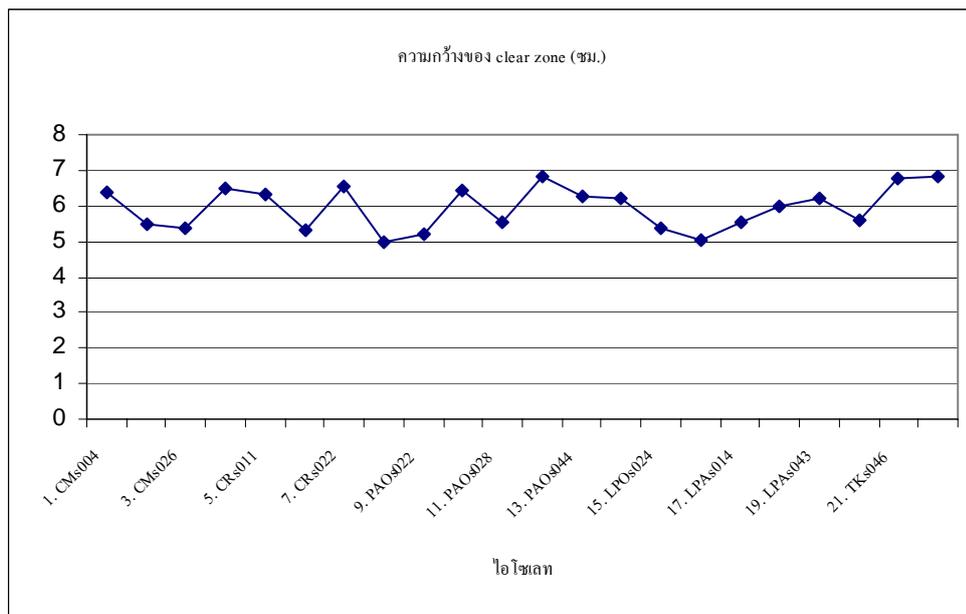
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการย่อยสลายไขมัน โดยการผสม Tributyrin 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 22 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายไขมันได้ดีแตกต่างกัน โดยมีความกว้างของ clear zone ขนาดแตกต่างกัน ไอโซเลทที่ให้ ความกว้างของ clear zone มากที่สุดคือ ไอโซเลท CMs026 โดยมีความกว้างเท่ากับ 3.90 เซนติเมตร ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 15 และภาพที่ 16)



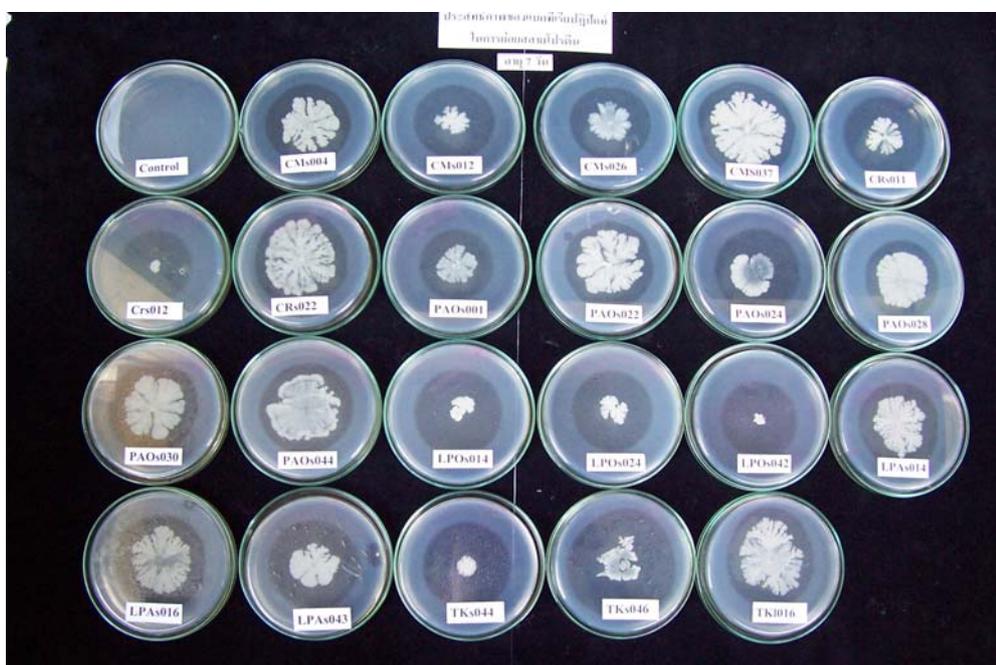
ภาพที่ 11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลต ในการละลายฟอสเฟต หลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน



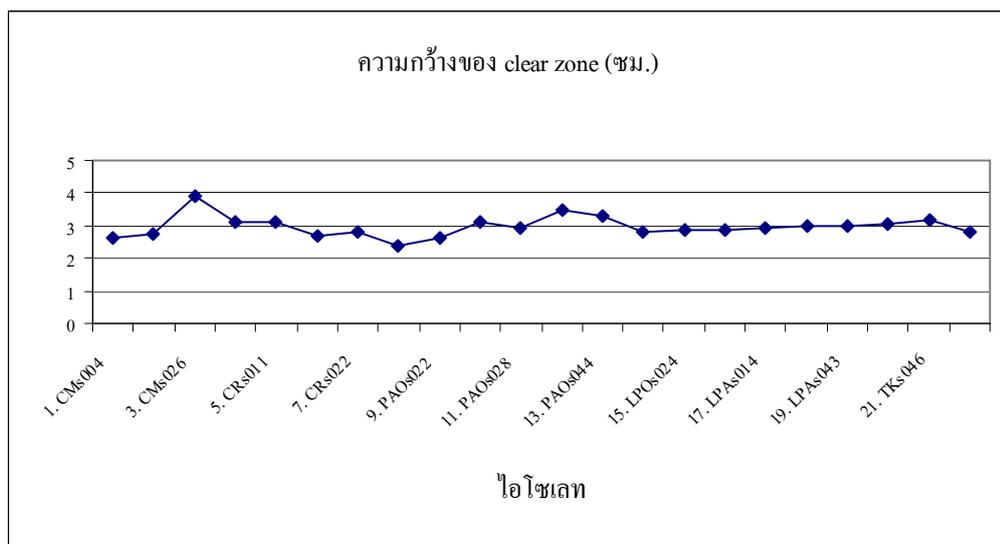
ภาพที่ 12 แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลต และประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟต หลังจากปลูกเชื้อ 30 วัน



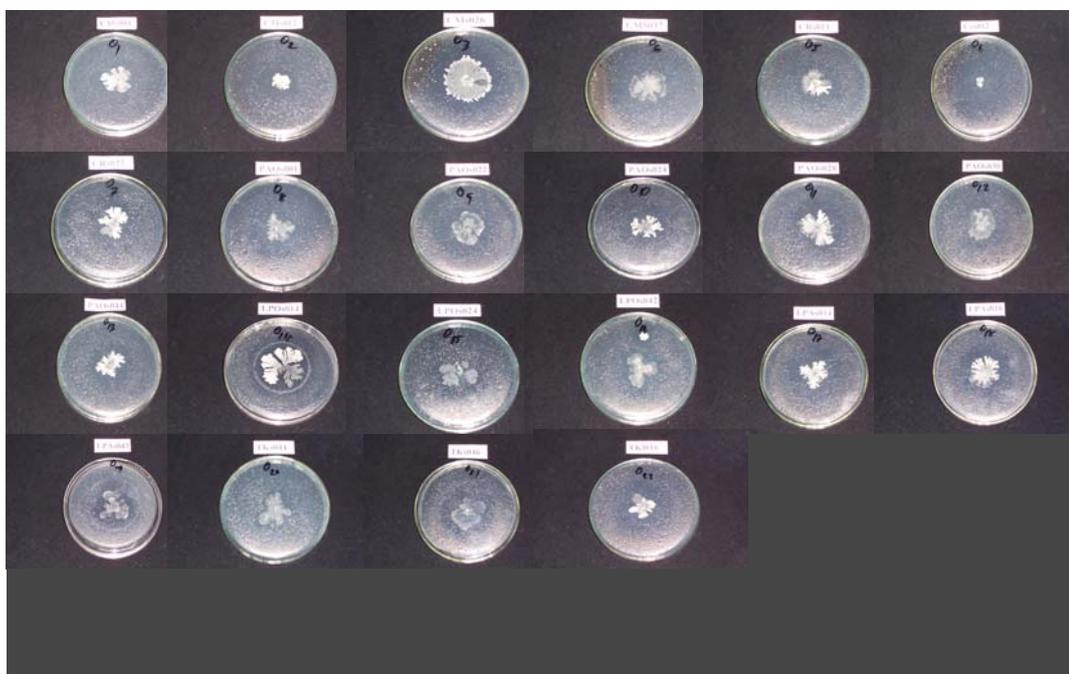
ภาพที่ 13 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิบัฏยจำนวน 22 ไอโซเลท ในการย่อยโปรตีน อายุ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ



ภาพที่ 14 แบคทีเรียปฏิบัฏยจำนวน 22 ไอโซเลทและประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลตในการ
ย่อยไขมัน หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน



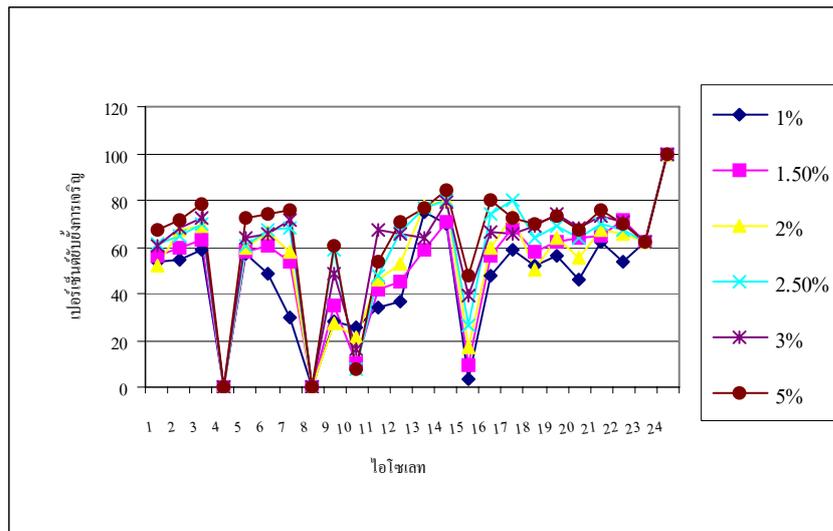
ภาพที่ 16 แบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 22 ไอโซเลต และประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน
หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน

6. ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรค ใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

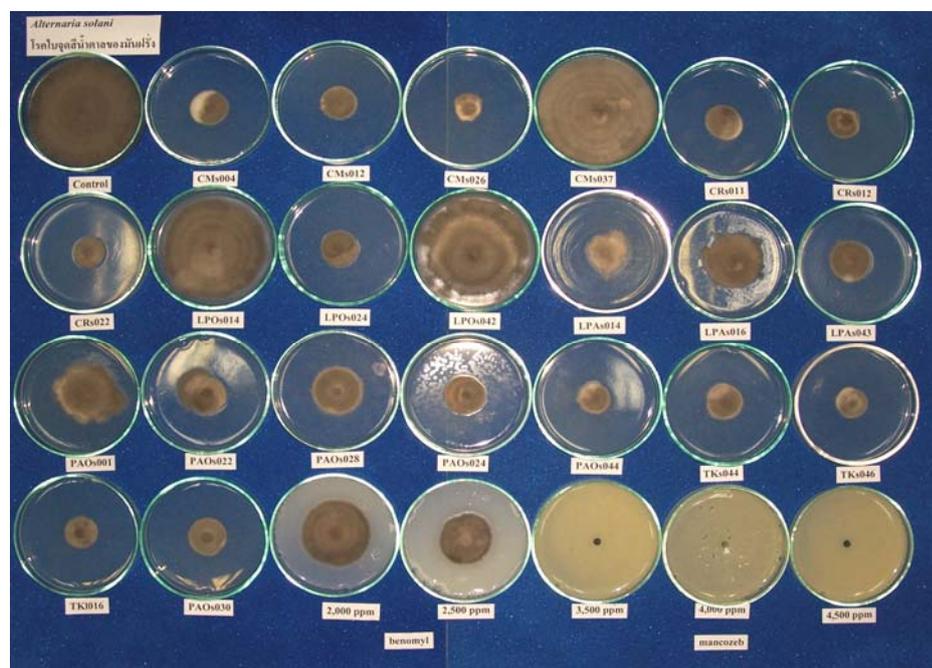
การนำสารทุติยภูมิที่สกัดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละ ไอโซเลทที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อัตราความเข้มข้นของสารละลาย 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 5 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benomy1 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 22 ไอโซเลท สามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer ได้ดีแตกต่างกัน ระดับ ความเข้มข้นของสารทุติยภูมิที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุได้ดีที่สุดคือ ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่สร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของราสาเหตุพืชได้ดีที่สุด 2 ไอโซเลท คือ CMs026 และ PAOs044 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ ได้ 78.45 % และ 72.78 % โดยที่สารเคมี benomy1 ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุได้เพียง 62.50 % (ภาพที่ 17 และภาพที่ 18)

7. การพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของ มันฝรั่ง

การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 2 ไอโซเลท ผสมกับสารพา (carrier) 4 ชนิดคือ dolomite, talcum power, hyflo supercell และ diatomaceous earth โดยมีความเข้มข้นของแบคทีเรียปฏิปักษ์เริ่มต้นที่ 10^{16} cfu/ml หลังจากเตรียมเสร็จเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ มีความชื้นในผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ โดยการ ทำ serial dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสารพาชนิด dolomite มีคุณสมบัติเหมาะสมในการ ใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMa026 และ PAOs044 เท่ากับ 4.5×10^{10} cfu/g และ 3.4×10^9 cfu/g ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 1 ปี และ นำมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย พบว่า ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 มีปริมาณเชื้อ 3.2×10^9 cfu/g และ 5.3×10^8 cfu/g ตามลำดับ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 19 และภาพที่ 20)



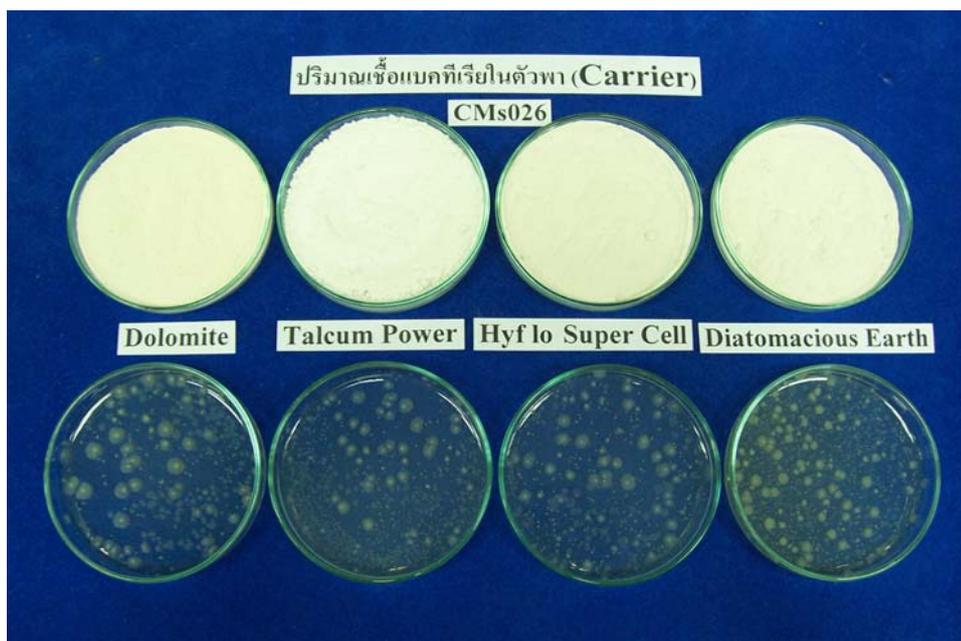
ภาพที่ 17 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิบัฏจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน



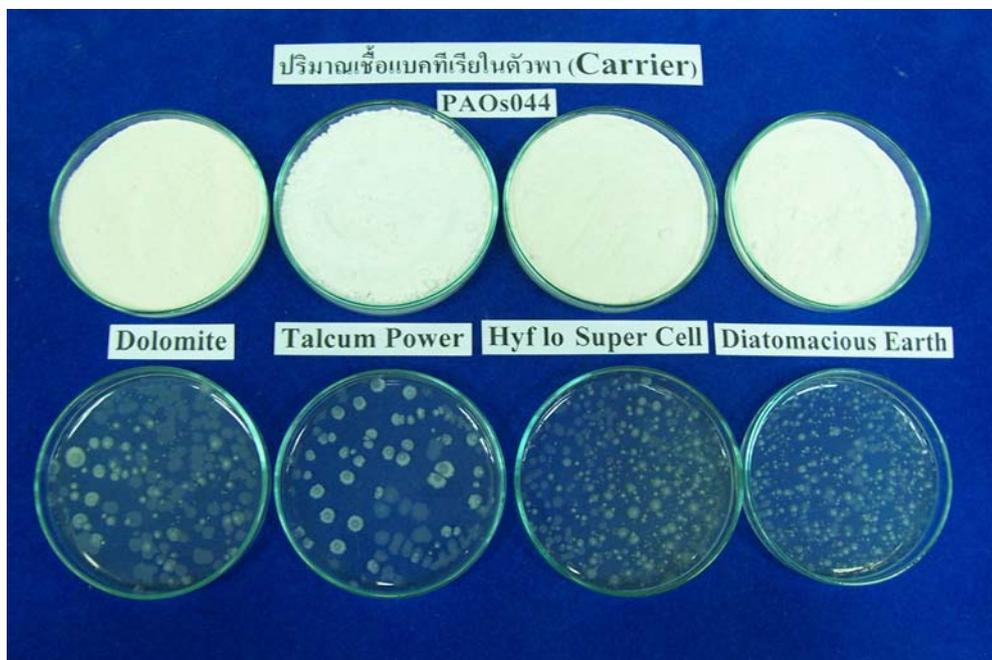
ภาพที่ 18 สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิบัฏจำนวน 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ในสารพาแต่ละชนิด
ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา

สารพา (Carrier)	ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 (cfu/g) ในระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ชีวภาพ				
	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
dolomite	4.5×10^{10}	4.1×10^{10}	6.3×10^9	4.7×10^9	3.2×10^9
talcum powder	7.5×10^9	2.9×10^9	1.7×10^9	4.2×10^9	1.2×10^8
hyflo supercell	3.2×10^9	5.2×10^9	2.1×10^9	4.8×10^8	2.2×10^8
diatomaceous earth	6.5×10^8	3.9×10^8	5.2×10^8	2.7×10^7	1.1×10^7
สารพา (Carrier)	ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท PAOs044 (cfu/g) ในระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ชีวภาพ				
	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
dolomite	3.4×10^9	4.2×10^9	3.3×10^9	8.2×10^8	5.3×10^8
talcum powder	6.2×10^9	4.1×10^9	7.0×10^8	6.2×10^8	3.7×10^8
hyflo supercell	7.2×10^8	3.6×10^8	2.1×10^8	7.6×10^7	5.1×10^7
diatomaceous earth	4.3×10^9	8.5×10^8	7.3×10^8	1.1×10^8	4.4×10^7



ภาพที่ 19 ผลผลิตกัมมันต์ชีวภาพจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต CMs026 ในสารพาแต่ละชนิด (แถวบน) และจำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้ (แถวล่าง)



ภาพที่ 20 ผลผลิตกัมมันต์ชีวภาพจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต PAOs044 ในสารพาแต่ละชนิด (แถวบน) และจำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้ (แถวล่าง)

8. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

จากการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ สารทุติยภูมิจากแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ และสารเคมี benomyl โดยทำการพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะปฏิชีวนะก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และหลังฉีดพ่นซ้ำอีกทุก 5 วันหลังฉีดพ่นครั้งแรก พบว่าหลังจากการฉีดพ่น 28 วัน ดำรับการทดลองที่ใช้สารเคมี benomyl สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 11.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ดำรับการทดลองที่ใช้เซลล์แขวนลอยจากแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 สามารถลดความรุนแรงของโรคโดยเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 23.33 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไอโซเลท CMs026 มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 25.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับดำรับควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายสูงถึง 56.67 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 21 และ ภาพที่ 22)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ภายหลังจากการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ตำรับ	เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ			
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
control (ไม่ปลูกเชื้อ)	3.33 ^l	5.00 ^k	1.67 ^j	1.67 ^j
ปลูกเชื้อราสาเหตุ	43.33 ^a	48.33 ^a	55.00 ^a	56.67 ^a
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	18.33 ^{ij}	21.67 ^{ghij}	25.00 ^{gh}	23.33 ^{defghi}
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	28.33 ^{ghi}	30.00 ^{cdefghi}	31.67 ^{efg}	26.67 ^{defg}
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	23.33 ^{ghi}	31.67 ^{cdefgh}	28.33 ^{fgh}	25.00 ^{defgh}
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	30.00 ^{cdefg}	33.33 ^{bcdefg}	36.67 ^{bcdef}	28.33 ^{def}
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	35.00 ^{abcde}	36.67 ^{abcdef}	41.67 ^{bcde}	31.67 ^{cd}
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	33.33 ^{bcdef}	36.67 ^{abcdef}	35.00 ^{defg}	30.00 ^{cde}
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (สารทุติยภูมิ)	36.67 ^{abcd}	43.33 ^{ab}	45.00 ^{abcd}	40.00 ^{bc}
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (สารทุติยภูมิ)	40.00 ^{ab}	41.67 ^{abcd}	48.33 ^{abc}	43.33 ^b
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (สารทุติยภูมิ)	36.67 ^{abcd}	43.33 ^{ab}	48.33 ^{abc}	41.67 ^{bc}
ปลูกเชื้อ+benomyl	13.33 ^{jk}	15.00 ^{ijk}	15.00 ⁱ	11.67 ^{hij}
CV %	20.39	25.07	22.15	26.01

^l ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 21 ความรุนแรงของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ภายหลังจากการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตำรับที่ 1-6) ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง



ภาพที่ 22 ความรุนแรงของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมะเขือเทศ ภายหลังจากการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตำรับที่ 7-12) ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

9. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

จากการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะ สารทุติยภูมิจากแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ และสารเคมี benomyl โดยทำการพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะปฏิชีวนะก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และหลังฉีดพ่นซ้ำอีกทุก 7 วัน หลังฉีดพ่นครั้งแรก พบว่าหลังจากการฉีดพ่น 21 วัน ดำรับการทดลองที่ใช้สารเคมี benomyl สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายเพียง 10.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ดำรับการทดลองที่ใช้เซลล์แขวนลอยจากแบคทีเรียปฏิชีวนะและผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 สามารถลดความรุนแรงของโรคโดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 10.83 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดำรับควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 15 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 24) หลังจากการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะและ ชีวผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นเวลา 21 วัน นำใบมันฝรั่งมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ได้ฉีดพ่นไป พบว่าปริมาณแบคทีเรียในแต่ละดำรับการทดลองปริมาณ 10^6 cfu/g (ตารางที่ 4 ภาพที่ 23) และเมื่อนำใบมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล มาตรวจดูกลไกการทำลายบนผิวใบโดยใช้ SEM พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะมีกลไกการสร้างสาร ทุติยภูมิทำลายเส้นใยและสปอร์ของราสาเหตุ (ภาพที่ 25)

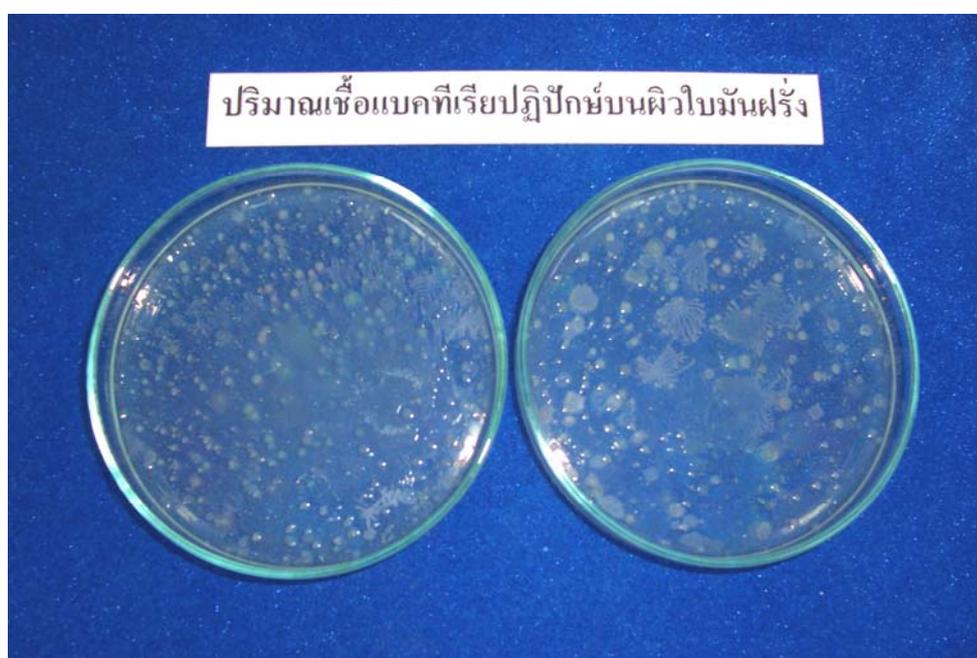
ตารางที่ 3 เปรอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง ภายหลังจากการฉีดพ่นราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพแปลงทดลอง

ตำรับ	เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง		
	7 day	14 day	21 day
control (ไม่ปลูกเชื้อ)	13.33a ^u	12.50j	16.67a
ปลูกเชื้อราสาเหตุ	23.33a	27.50abcd	15.00a
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	17.50a	21.67bcdefghi	10.83a
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	20.50a	24.17abcdef	11.67a
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย)	19.17a	20.00cdefghij	10.83a
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	20.83a	23.33bcdefgh	12.50a
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	18.34a	23.33bcdefgh	13.33a
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	20.00a	25.83abcde	12.50a
ปลูกเชื้อ+ CMs026 (สารทุติยภูมิ)	20.83a	28.34abc	15.00a
ปลูกเชื้อ+PAOs044 (สารทุติยภูมิ)	23.33a	31.67a	15.83a
ปลูกเชื้อ+ CMs026+ PAOs044 (สารทุติยภูมิ)	21.67a	30.00ab	16.67a
ปลูกเชื้อ+benomyl	15.83a	16.67efghij	10.00a
CV %	26.44	15.66	23.93

^u ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวไขมันฝรั่งหลังจากการฉีดพ่นในแปลงทดลอง

ตำรับ	ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/g) บนผิวไขมันฝรั่ง หลังจากการฉีดพ่น 21 วัน		
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3
ไอโซเลท CMs026	1.5×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6
ไอโซเลท PAOs044	7.6×10^7	5.0×10^6	4.6×10^6
ไอโซเลท CMs026+PAOs044	3.8×10^7	1.8×10^6	1.6×10^6
ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ CMs026	3.3×10^6	4.5×10^5	5.0×10^6
ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ PAOs044	2.1×10^6	6.6×10^6	6.0×10^6
ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ CMs026+PAOs044	1.5×10^6	6.5×10^6	6.4×10^6



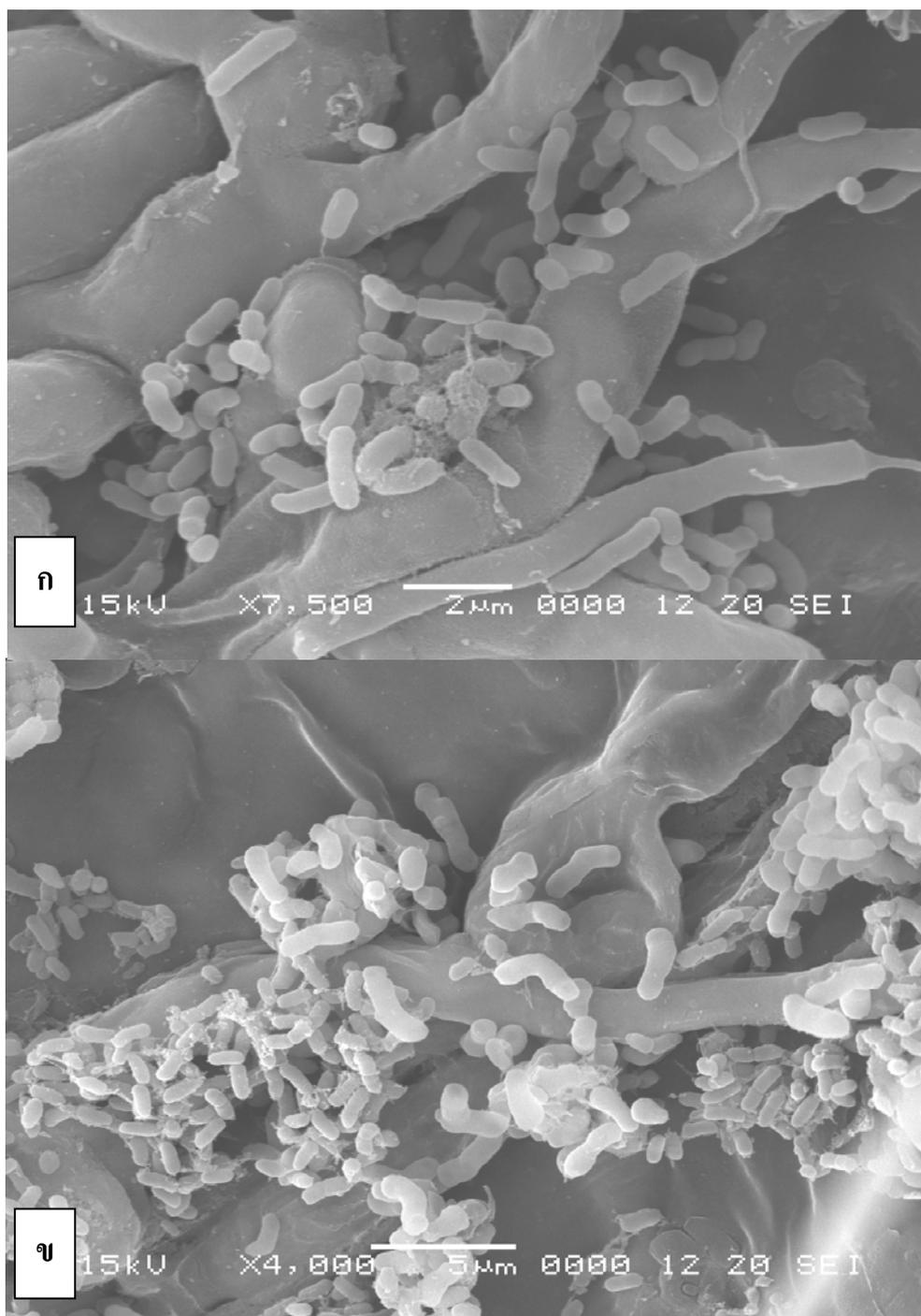
ภาพที่ 23 ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวไขมันฝรั่ง หลังจากการฉีดพ่นในแปลงทดลอง 21 วัน



ภาพที่ 24 แปลงปลูกมันฝรั่งทดลอง ก่อนและภายหลังจากการปลูกเชื้อราสาเหตุ

ก แปลงทดลองก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ

ข ความรุนแรงของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง ภายหลังจากการฉีดพ่น
ราสาเหตุและแบคทีเรียปฏิปักษ์



ภาพที่ 25 แบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างสารทุติยภูมิทำลายเส้นใยราสาเหตุ *Alternaria solani* Sorauer บนผิวไบบิ้นฝรั่ง อายุ 3 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อราสาเหตุ ทำให้เส้นใยของราสาเหตุเหี่ยวแฟบลง (ก และ ข)

วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียจำนวน 509 ไอโซเลท ที่แยกเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์จากผิวใบมันฝรั่งและดินบริเวณแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในพื้นที่ 6 จังหวัดในภาคเหนือ ซึ่งประกอบด้วย จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพของการเป็นปฏิปักษ์กับราสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งแล้ว พบว่ามีจำนวน 22 ไอโซเลท และทั้งหมดสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Bacillus* spp. โดยมีปริมาณแบคทีเรียในช่วง 10^5 - 10^7 cfu/g แม้ว่าในแปลงปลูกของเกษตรกรดังกล่าวจะมีการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากก็ตาม ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Aslim *et al.* (2002) ในประเทศตุรกี ซึ่งทำการแยกแบคทีเรียจากดินแปลงเกษตรกรที่มีความแตกต่างกันของสภาพพื้นที่ 6 สภาพ โดยพบแบคทีเรีย 40 สายพันธุ์ และทั้งหมดจำแนกชนิดได้เป็น *Bacillus* spp. ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* 8 ไอโซเลท *B. megaterium* 6 ไอโซเลท *B. firmus* 5 ไอโซเลท *B. sphaericus* 4 ไอโซเลท *B. thuringiensis* 3 ไอโซเลท *B. pumilus* 1 ไอโซเลท และ *Bacillus* spp. 13 ไอโซเลท

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 22 ไอโซเลท ในการสร้างสารทุติยภูมิพบว่า ทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง 121°C ระยะเวลา 30 นาที ซึ่งยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุได้ดี โดยไอโซเลทที่สร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สูงที่สุด คือ ไอโซเลท CMs026 และ ไอโซเลท PAOs044 สอดคล้องกับรายงานของ Peng and Mustafa (2003) ที่กล่าวว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สร้างสารทุติยภูมิที่อยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin, mycosubtilin และ mycobacillin รวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์ subtilin และ levansucrase บางชนิดมีความสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดี รวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุ โรคพืชหลายชนิดได้ดี การวิจัยครั้งนี้ยังมีได้ทำการจำแนกชนิดของสารทุติยภูมิที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 22 ไอโซเลทสร้างขึ้น ซึ่งจะได้ทำการจัดจำแนกในโอกาสต่อไป การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 22 ไอโซเลท ในการสร้างเอนไซม์พบว่า ไอโซเลท PAOs044 มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนและฟอสเฟตได้ดี ดังที่ Pual and Sundara Rao (2005) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินในบริเวณแปลงปลูกถั่ว ในประเทศอินเดีย พบแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตในดินได้มีจำนวน 6 ชนิดคือ เช่น *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. pulvifaciens*, *B. pumilus* and *B. polymyxa* แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท CMs026 มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Wierzba and Latala (2007) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ในการย่อยไขมัน

ชนิด lipolytic, proteolytic และ cellulolytic ได้แก่ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Cellulomonas* sp. และ *Cytophaga* sp.

การนำแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ผสมกับสารพา 4 ชนิด เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ พบว่า dolomite มีคุณสมบัติเหมาะสม โดยมีอายุการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 1 ปี สอดคล้องกับรายงานของ ซอติพิย์ (2538) ได้ศึกษาพัฒนาผงชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิชีวนะ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-35 °C เป็นเวลา 6 เดือน โดยมีการผสมแบคทีเรียปฏิชีวนะกับรำข้าวเพื่อเป็นอาหารและผงทัลคัม นอกจากนี้ Setlow (1995) ได้รายงานไว้ว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. มีความสามารถในการสร้างสปอร์ในรูปแบบของเอนโดสปอร์ที่มีความสามารถในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน และรังสี UV การนำผลิตภัณฑ์ชีวภาพไปใช้ควบคุมโรคพืชในแปลงทดลอง แบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะต้องมีการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เช่น ทนต่อแสง UV หรือความแห้งแล้ง และมีอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ในการควบคุมโรคในมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้น้อยกว่าการใช้สารเคมี สอดคล้องกับรายงานของ Sanyong (1992) ซึ่งได้แยกแบคทีเรียปฏิชีวนะจากใบมันฝรั่ง จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ (late blight) ของมันฝรั่งในห้องปฏิบัติการ สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุได้ดี การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลองโดยแบคทีเรียปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี chlorothalonil พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี ซึ่งการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูกพืชนั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมนบผิวใบพืช อุณหภูมิในอากาศ ความชื้นในดิน หรืออาจเกิดจากประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะ เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วในสภาพธรรมชาติ ทำให้ขาดคุณสมบัติในการใช้อาหารและพื้นที่ผิว จึงไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ (ยอดชาย, 2544) หรืออาจเกิดเนื่องจากแบคทีเรียปฏิชีวนะสูญเสียความสามารถในการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกมาจากสภาพห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลองหรือแปลงปลูกไม่สามารถปรับตัวและดำเนินกิจกรรมต่างๆ ได้ ดังที่ กาญจน (2542) ได้รายงานถึงการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้จุลินทรีย์

ที่แยกได้จากแปลงปลูก พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ดีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง แต่การควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลองพบว่า สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ นิพนธ์ (2533) ได้กล่าวว่า ความสำเร็จในการนำจุลินทรีย์ไปใช้ควบคุมโรคที่เกิดกับส่วนเหนือดินของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย หรือรา ยังมีความจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดต่างๆ เพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะธรรมชาติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค โดยเฉพาะนิเวศวิทยาของเชื้อ และปฏิกริยาร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิดบนพืช จะช่วยให้ทราบกลไกโดยละเอียดของการควบคุมโรค และสามารถนำมาปรับใช้ให้เกิดประสิทธิภาพได้สูงสุด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีควรเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนผิวใบพืช หรือครอบคลุมส่วนต่างๆ ของโรคพืชได้ดีทุกสภาพอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทนสภาพอากาศแห้ง หรือแสงแดดได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ควรมีคุณสมบัติที่ทนต่อจุลินทรีย์อื่นในธรรมชาติได้ดี หรือมีความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในธรรมชาติได้ดี ตลอดจนทนต่อสภาพการใช้สารเคมีในทางการเกษตรได้ดีอีกด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การแยกแบคทีเรียจากดินและผิวไบโอมันฝรั่ง จากแหล่งปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และจังหวัดตาก พบแบคทีเรียจำนวน 509 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer จำนวน 22 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุสูงที่สุด 2 ไอโซเลท คือ CMs026 และ PAOs044

การทดสอบประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี benomyl พบว่า ทั้ง ไอโซเลท CMs026 และ ไอโซเลท PAOs044 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุสูงกว่า benomyl ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพ ในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนไขมัน และฟอสเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท PAOs044 มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนและฟอสเฟตได้ดี ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 มีคุณสมบัติในการย่อยไขมันได้ดี

การพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ใช้สารพา 4 ชนิดคือ dolomite, talcum power, hyflo supercell และ diatomaceous earth พบว่าสารพาชนิด dolomite มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง พบว่าสารเคมี benomyl มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่เซลล์แขวนลอยจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026

การจัดจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่า ไอโซเลท CMS026 คือ *Bacillus subtilis* และ ไอโซเลท PAOs044 คือ *Bacillus* sp.

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลอง การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งที่เกิดจากรา *Alternaria solani* Sorauer สามารถทำการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยการทดสอบประสิทธิภาพและคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราสาเหตุชนิดอื่นๆ การทดสอบประสิทธิภาพและคุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) การศึกษาชนิดและโครงสร้างของสารทุติยภูมิที่สร้างโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 รวมถึงการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อที่ได้ทดสอบคุณภาพเบื้องต้น เพื่องานวิจัยในระดับสภาพแปลงปลูก และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพในเชิงการค้า

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2541. **มันฝรั่งและศัตรูที่สำคัญ**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 22 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. **การส่งออกและนำเข้าสินค้าพืชสวนของไทย**. ศูนย์สารสนเทศกรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ.

_____. 2551. **สถิติการปลูกพืช**. ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ.

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. 2542. **การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้จุลินทรีย์ต่อต้านโรค**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เกษม สร้อยทอง. 2538. **การใช้คีโตเมียมควบคุมเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืช**, น. 170-191. ใน สมคิด ศิสถาพร. **เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช**. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ไกรวุฒิ เกตุลอย. 2544. **การเปรียบเทียบสูตรอาหารและวิธีการกระตุ้นการสร้างสปอร์เชื้อรา *Alternaria solani* สาเหตุโรคนิ่วใหม่ของมะเขือเทศ**. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2531. **อิทธิพลของสายพันธุ์และปริมาณเชื้อโรคและการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ต่อการเกิดโรคเหี่ยวของฟิวซาเรียมในฝ้าย 4 สายพันธุ์** รายงานผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

_____. 2534. **การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- ช่อทิพย์ ถนอมกลิ่น. 2538. การใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ *Erwinias* สาเหตุโรคน้ำและในมันฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2546. **ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์.** ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2533. **นิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- มานะ กาญจนมณีเสถียร , อนงค์ หนูด้วง และสาถล สุวลักษณ์. 2543. การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ. วารสารกรมวิชาการเกษตร. 18 (1): 4-6.
- ยอดชาย นิ่มรักษา. 2544. **การควบคุมโรคใบจุดและใบไหม้ของสตรอเบอร์รี่โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- รุจิพร ประทีปเสน. 2541. **การเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.** ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- วราภรณ์ สุทธิสา. 2545. **การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2540. **การจัดการโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ศุภรัตน์ ฉัตรจริยเวสน์, กิ่งกาญจน์ วงศ์สุทธิโชติ, สุริยา สาสนรักกิจ และ มะลิ บุญยรัตผลิน. 2548. **การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** สำนักวิชาการ กรมประมง. กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, จารุวรรณ นามน้ำวแสง, สมใจ ศิริโชค และ ขจีนาฏ โพธิเวชกุล. 2549. การแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส เคซีเนส และเซลลูเลส จากน้ำหมักชีวภาพเอเอ็ม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ.

Agrios, G.N. 1988. **Diseases caused by ascomycetes and imperfect fungi. Plant Pathology**, Third edition. Academic Press, Inc.

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

Aslim, B., N, Saglam. and Y., Beyatli. 2002. Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. **Turk J Biol** 26: 41-48

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. **Biological Control of Plant Pathogen.** W.H. Freeman, San Francisco.

Beagle-Ristaino, J.E. and G.C., Papavizas. 1985. Biological control of Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato. **Phytopathology.** 75: 560-564.

Blachinski, D., D. Shtienberg and A. Dinooor. 1996. Influence of Foliar Application of nitrogen and Potassium on Alternaria Diseases in Potato ,Tomato and Cotton. **Phytoparasitica.** 24 (4): 281-292.

Broadbent, P., K.F. Baker., N. Frank. and J. Holland. 1977. Effect of *Bacillus* spp. an increased growth of seedling in stremed and in nontreated soil. **Phytopathology.** 67: 1027-1034.

- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **The American Phytopathological Society**. St. Paul, Minnesota.
- Collins, D.P., B.J. Jacobsen. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological Control**. 26: 153-161.
- Coquoz, J.L., A.J. Buchala., P.H. Meuwly. and J.P. Mettraux. 1995. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**. 85: 1219-1224.
- Fiddaman, P.J. and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Apply Bacteriology**. 74: 119-126.
- Fiddaman, P.J., T.M.O. Neill. and S. Rossall. 2000. Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using disc bioassays. **Ann. Appl. Biol.** 137: 223-235
- Fravel, D.R. and J.R. Spurr. 1971. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. **Phytopathology**. 73: 1318 (Abstr.)
- Gesnara, W. 1994. **Study on *Trichoderma harzianum* as a potential biocontrol agent of tomato and barley disease caused by *Sclerotium rolfsii* : emphasis on fermentation biomass**. Ph.D. thesis, Kasetsart University Bangkok. 110 p.
- Gnanamanickam, S.S. 2002. **Biological Control of Crop Diseases**. Marcel Dekker, Inc.
- Hooker, W. J. 1981. **Compendium of Potato Diseases**. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota USA.

- Holliday, p. 1980. **Fungus Diseases of Tropical Crop**. Cambridge University Press.
- Kempe, J. and L, Sequiera. 1983. Biological control of bacterial wilt of potato : attempt to induce resistance by treating tuber with bacteria. **Plant Disease**. 67 : 499-503.
- Kilian, M., U. Steiner., B. Krebs., H. Junge., G. Schmiedeknecht and R. Hain. 2003. **FZB24 *Bacillus subtilis*—mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality**. <http://www.bayercropscience.com> (20/12/2547)
- Kurek, E. and J. Jaroszuk-Seisel. 2003. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interaction with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. **Biological Control**. 26 : 48-56.
- Mathre, D.E., R.J. Cook and N.W. Callan. 1999. From Discovery to Use : Traversing the World of Commercializing Biocontrol Agents for Plant Disease Control. **Plant Disease**. 83 : 972-983.
- Peng, L.P. and M. Mustafa. 2003. **Production of non-volatile antifungal from *Bacillus subtilis* on selected solid medium**. <http://www.fsas.upm-edu.my/~muska/Thesis%20AH%20Peng.pdf> (20/12/2547).
- Pual, N. B. and Sundara Rao, W. V. B. 2005. Phosphate- dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. **Journal of Plant and Soil**. 35:127-132.
- Sanyong, S. 1992. **Studies on tissue culture derived potato plant and callus for resistance to culture filtrate of *Phytophthora infestans* (Mont.) D Bary and Biological**. Ph.D. thesis, Kaestsart University Bangkok. 192.
- Setlow, P. 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. **Annual Review of Microbiology**. 49: 29-54.

- Sharga, B.M. and G.D.L, Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS107 as an antagonist of potato blackleg and spft rot bacteria. **Can J. Microbiology.** 44 : 777-783.
- Silva, H.S.A., R.S. Romerio., D.M.B.A. Halfeld-Vieira., M.C.B. Pereira. and A. Munteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants : non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control.** 29 : 288-295.
- Thomma, P.H.J. 2003. *Alternaria* spp. : from saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology.** 4 (4) : 225-236.
- Thomson, J. 1987. **The use of agrocin-producing bacteria in the biological control of crown gall. pp. 213-228. In L. Chet (ed) Inovative Approaches to Plant Disease Control.** John Wiley & Sons, New York.
- Viji, G., W. Uddin. and C.P. Romaine. 2003. Suppression of gray leaf spot (blast) of perennial ryegrass turf by *Pseudomonas aeruginosa* from spent mushroom substrate. **Biological Control.** 26 : 233-243.
- Weller, D.M., J.M., Raaijmakers., B.B., McSpadden Gardener and L.S., Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** 40 : 309-348.
- Wierzba, S and A, Latala. 2007. Evaluation of the enzymatic activity of selected bacterial strains. **Polish Journal of Chemical Technology.** 9 (2) 68-72.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient Agar (NA)

meat extract	3.0 g.
peptone	5.0 g.
agar	15-17 g.
distilled water	1.0 l.

media มีลักษณะสีน้ำตาลใช้เลี้ยงแบคทีเรียทั่วไป โดยปกติแล้วแบคทีเรียทุกชนิดสามารถเจริญได้ แต่ไม่สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียได้

Potato Dextrose Agar (PDA)

dextrose หรือ glucose	20.0 g.
potato (ปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่าลูกเต๋า)	200.0 g.
agar	15-17 g.
distilled water	1.0 l.

วิธีเตรียม เริ่มโดยการต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ในน้ำกลั่น 500 ml. ให้เดือดประมาณ 10-15 นาที เนื้อมันฝรั่งจะนิ่มแต่ไม่เละ แล้วกรองเอาแต่น้ำ ละลายน้ำตาล Dextrose หรือ Glucose และ Agar ในน้ำกลั่น 500 ml. ต้มจนวุ้นละลาย (หมั่นกวนอย่าให้วุ้นติดก้นภาชนะ) เทน้ำมันฝรั่งที่ได้ผสมลงไป เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร Media มีสีน้ำตาลอ่อน ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา

หมายเหตุ ในกรณีที่เตรียมจากผงสำเร็จรูปของ Potato Dextrose Agar ใช้ PDA สำเร็จรูปจำนวน 39.0 g. agar 6.0 g. distilled water 1.0 l.

Skim Milk Agar (SM)

skim milk	2.0 g.
glucose	1.0 g.
K_2HPO_4	0.2 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g.

FeSO ₄	trace (เล็กน้อย)
agar	15-17 g.
distilled water	1.0 l.

ใช้แยกแบคทีเรียย่อยโปรตีน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อไม่ให้โปรตีน จากนมเสียสภาพไปเพราะความร้อน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น อาหารที่เตรียมได้จะมีสีขาวขุ่น เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้ เมื่อเจริญบน SM จะมีบริเวณใสๆ (clear zone) รอบๆ colony นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกเชื้อราบางชนิดที่ย่อยโปรตีนได้

Pikovakaya Agar (Piko)

glucose	10 g.
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g.
NaCl	0.2 g.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g.
KCl	0.2 g.
yeast extract	0.5 g.
MnSO ₄ · 7H ₂ O	trace (เล็กน้อย)
FeSO ₄ · 7H ₂ O	trace (เล็กน้อย)
agar	15-18 g.
distilled water	1.0 l.

ใช้สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตได้ Media ที่ได้จะมีตะกอนสีขาวขุ่น ก่อนใช้ให้ทำการเขย่าให้ตะกอนละลายก่อน ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีต ให้เติมสารละลาย Actidion (เพื่อยับยั้งเชื้อรา) ถ้าจะคัดแยกเชื้อรา เติมสารละลาย Streptomycin (เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและแอกติโนมัยซีต) เชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบฟอสเฟตได้ จะมีบริเวณใสๆ รอบ colony

Tributylin Agar (Emulsion tributyrin)

Yeast extract	2.0 g.
peptone	3.0 g.
T ₁₀ Tributyrin	1%
agar	18 g.
distilled water	1.0 l.

ไข่แยกแบคทีเรียย่อยไขมัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ไข่แยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยไขมันได้ เมื่อเจริญบนอาหาร จะมีบริเวณใสๆ (clear zone) รอบๆ colony

Sabouraud Glucose Broth

glucose	20 g.
mycological peptone	10 g.
distilled water	1.0 l.

media มีลักษณะสีน้ำตาลใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตสารทุติยภูมิ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Percentage of inhibition					
Chiangmai	Chiangrai	Lumphun	Lampang	Payao	Tak
CMs001=24.5	CRs00=9.2	LPOs001=7.1	LPAs001=0	PAOs001=63.4	TKs001=0
CMs002=32.2	CRs002=28.3	LPOs002=6.53	LPAs002=14.0	PAOs002=18.9	TKs002=48.9
CMs003 =2.6	CRs003=4.0	LPOs003=37.4	LPAs003=57.7	PAOs003=42.3	TKs003=39.3
CMs004=67.0	CRs004=6.9	LPOs004=51.8	LPAs004=61.9	PAOs004=8.7	TKs004=7.9
CMs005=23.9	CRs005=14.3	LPOs005=1.9	LPAs005=29.0	PAOs005=0	TKs005=48.3
CMs006=28.3	CRs006=5.6	LPOs006=5.0	LPAs006=49.0	PAOs006=47.5	TKs006=53.6
CMs007=39.0	CRs007=9.0	LPOs007=0	LPAs007=9.8	PAOs007=38.3	TKs007=0
CMs008=42.2	CRs008=37.9	LPOs008=35.5	LPAs008=14.3	PAOs008=60.1	TKs008=15.5
CMs009=19.6	CRs009=0	LPOs009=67.5	LPAs009=45.5	PAOs009=65.6	TKs009=38.2
CMs010 =9.7	CRs010=10.6	LPOs010=73.3	LPAs010=19.6	PAOs010=36.3	TKs010=12.8
CMs011=3.7	CRs011=0	LPOs011=23.8	LPAs011=18.1	PAOs011=64.0	TKs011=45.2
CMs012=57.8	CRs012=75.5	LPOs012=37.3	LPAs012=52.7	PAOs012=37.7	TKs012=55.7
CMs013=32.8	CRs013=10.1	LPOs013=35.2	LPAs013=72.3	PAOs013=31.9	TKs013=26.5
CMs014=29.7	CRs014=11.8	LPOs014=47.6	LPAs014=41.7	PAOs014=49.7	TKs014=41.8
CMs015=9.6	CRs015=4.1	LPOs015=14.6	LPAs015=59.3	PAOs015=39.0	TKs015=27.9
CMs016=24.3	CRs016=5.5	LPOs016=48.0	LPAs016=39.3	PAOs016=39.2	TKs016=61.8
CMs017=7.5	CRs017=6.9	LPOs017=0	LPAs017=73.1	PAOs017=44.3	TKs017=0
CMs018=37.9	CRs018=7.3	LPOs018=35.5	LPAs018=0	PAOs018=13.5	TKs018=25.7
CMs019=13.7	CRs019=9.3	LPOs019=16.3	LPAs019=41.2	PAOs019=51.6	TKs019=15.1
CMs020=32.8	CRs020=5.5	LPOs020=46.1	LPAs020=23.6	PAOs020=28.0	TKs020=19.8
CMs021=6.3	CRs021=0	LPOs021=35.5	LPAs021=49.1	PAOs021=52.6	TKs021=41.7
CMs022=0	CRs022=5.2	LPOs022=36.9	LPAs022=29.3	PAOs022=32.3	TKs022=46.1
CMs023=43.8	CRs023=5.7	LPOs023=71.3	LPAs023=56.1	PAOs023=69.7	TKs023=30.5
CMs024=2.7	CRs024=0	LPOS024=0	LPAs024 =59.3	PAOs024=29.3	TKs024=30.5

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Percentage of inhibition					
Chiangmai	Chiangrai	Lumphun	Lampang	Payao	Tak
CMs025 =6.9	CRs025=5.8	LPOs025=17.7	LPAs025=61.2	PAOs025=32.3	TKs025=50.5
CMs026=64.1	CRs026=5.7	LPOs026=46.2	LPAs026=0	PAOs026=52.1	TKs026=14.7
CMs027= 5.5	CRs027=5.5	LPOs027=12.1	LPAs027=26.1	PAOs027=19.3	TKs027=46.1
CMs028= 4.1	CRs028=17.5	LPOs028=47.2	LPAs028=0	PAOs028=61.2	TKs028=44.8
CMs029= 4.4	CRs029=13.3	LPOs029=13.1	LPAs029=59.1	PAOs029=43.6	TKs029=69.1
CMs030=60.5	CRs030=13.8	LPOs030=42.0	LPAs030=67.3	PAOs030=40.1	TKs030=51.3
CMs031=13.8	CRs031=17.3	LPOs031=0	LPAs031=17.9	PAOs031=43.5	TKs031=34.7
CMs032=5.5	CRs032=4.1	LPOs032=3.0	LPAs032=7.3	PAOs032=72.2	TKs032=71.3
CMs033=4.7	CRs033=0	LPOs033=42.3	LPAs033=76.3	PAOs033=21.9	TKs033=47.3
CMs034=50.5	CRs034=74.1	LPOs034=43.4	LPAs034=43.5	PAOs034=13.8	TKs034=19.4
CMs035=19.4	CRs035=0	LPOs035=31.7	LPAs035=45.9	PAOs035=35.5	TKs035=0
CMs036=3.3	CRs036=0	LPOs036=0	LPAs036=23.2	PAOs036=55.1	TKs036=52.7
CMs037=5.5	CRs037=11.9	LPOs037=5.56	LPAs037=0	PAOs037=37.0	TKs037=50.7
CMs038=6.3	CRs038=13.8	LPOs038=77.7	LPAs038=14.1	PAOs038=0	TKs038=51.1
CMs039=11.1	CRs039=5.5	LPOs039=4.3	LPAs039=50.1	PAOs039=33.8	TKs039=65.5
CMs040=49.7	CRs040=5.1	LPOs040=32.4	LPAs040=56.5	PAOs040=0	TKs040=52.1
CMs041=0	CRs041=7.3	LPOs041=50.5	LPAs041=12.2	PAOs041=24.1	TKs041=57.3
CMs042=5.5	CRs042=5.6	LPOs042=0	LPAs042=0	PAOs042=42.4	TKs042=0
CMs043=5.5	CRs043=13.0	LPOs043=49.7	LPAs043=13.8	PAOs043=50.5	TKs043=33.0
CMs044=50.5	CRs044=19.1	LPOs044=64.4	LPAs044=45.5	PAOs044=62.9	TKs044=51.9
CMs045=77.3	CRs045=50.5	LPOs045=15.5	LPAs045=51.1	PAOs045=42.7	TKs045=65.3

หมายเหตุ CMs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงใหม่ CRs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดเชียงราย LPOs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำพูน LPAs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดลำปาง PAOs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดพะเยา และ TKs = แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่งจังหวัดตาก

ตารางผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง ในการยับยั้งการเจริญของรา
Alternaria solani Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

Percentage of inhibition					
Chiangmai	Chiangrai	Lumphun	Lampang	Payao	Tak
CM1001=5.3	CR1001=3.0	LPO1001=50.1	LPA1001=4.8	PAO1001=11.5	TK1001=8.9
CM1002=6.5	CR1002=18.1	LPO1002=16.5	LPA1002=4.8	PAO1002=28.3	TK1002=8.7
CM1003=8.5	CR1003=14.1	LPO1003=7.4	LPA1003=4.8	PAO1003=10.1	TK1003=11.6
CM1004=56.2	CR1004=7.2	LPO1004=11.8	LPA1004=9.3	PAO1004=5.6	TK1004=9.2
CM1005=13.8	CR1005=19.0	LPO1005=0	LPA1005=2.7	PAO1005=16.3	TK1005=14.3
CM1006=46.8	CR1006=19.4	LPO1006=5.0	LPA1006=12.0	PAO1006=4.0	TK1006=5.6
CM1007=6.5	CR1007=16.2	LPO1007=0	LPA1007=6.4	PAO1007=7.7	TK1007=5.6
CM1008=8.8	CR1008=6.7	LPO1008=5.5	LPA1008=4.8	PAO1007=11.9	TK1008=13.4
CM1009=3.1	CR1009=5.7	LPO1009=17.5	LPA1009=44.3	PAO1009=19.0	TK1009=8.9
CM1001=5.0	CR1010=4.45	LPO1010=13.3	LPA1010=6.9	PAO1010=9.0	TK1010=19.3
CM1011=6.6	CR1011=2.23	LPO1011=13.8	LPA1011=6.3	PAO1011=19.8	TK1011=37.9
CM1012=46.8	CR1012=8.7	LPO1012=17.3	LPA1012=5.5	PAO1012=24.3	TK1012=48.3
CM1013=6.5	CR1013=5.0	LPO1013=15.2	LPA1013=3.0	PAO1013=13.3	TK1013=5.6
CM1014=16.1	CR1014=3.3	LPO1014=7.6	LPA1014=12.0	PAO1014=10.6	TK1014=1.1
CM1015=4.6	CR1015=9.7	LPO1015=4.6	LPA1015=10.1	PAO1015=18.1	TK1015=75.5
CM1016=3.4	CR1016=6.5	LPO1016=18.0	LPA1016=0	PAO1016=12.7	TK1016=78.2
CM1017=37.5	CR1017=6.9	LPO1017=8.3	LPA1017=3.6	PAO1017=32.3	TK1017=2.8
CM1018=11.2	CR1018=10.6	LPO1018=5.5	LPA1018=4.8	PAO1018=19.7	TK1018=0
CM1019=3.3	CR1019=6.8	LPO1019=6.3	LPA1019=4.8	PAO1019=9.3	TK1019=15.7
CM1020=6.2	CR1020=5.2	LPO1020=4.1	LPA1020=4.8	PAO1020=19.3	TK1020=6.5
CM1021=14.0	CR1021=6.2	LPO1021=5.5	LPA1021=3.3	PAO1021=5.1	TK1021=11.8
CM1022=4.4	CR1022=7.9	LPO1022=6.9	LPA1022=5.1	PAO1022=9.3	TK1022=7.9
CM1023=45.2	CR1023=8.0	LPO1023=7.3	LPA1023=5.5	PAO1023=11.2	TK1023=9.8
CM1024=33.4	CR1024=5.4	LPO1024=6.9	LPA1024=0	PAO1024=13.6	TK1024=5.2
CM1025=5.0	CR1025=2.7	LPO1025=7.7	LPA1025=14.8	PAO1025=4.1	TK1025=5.7

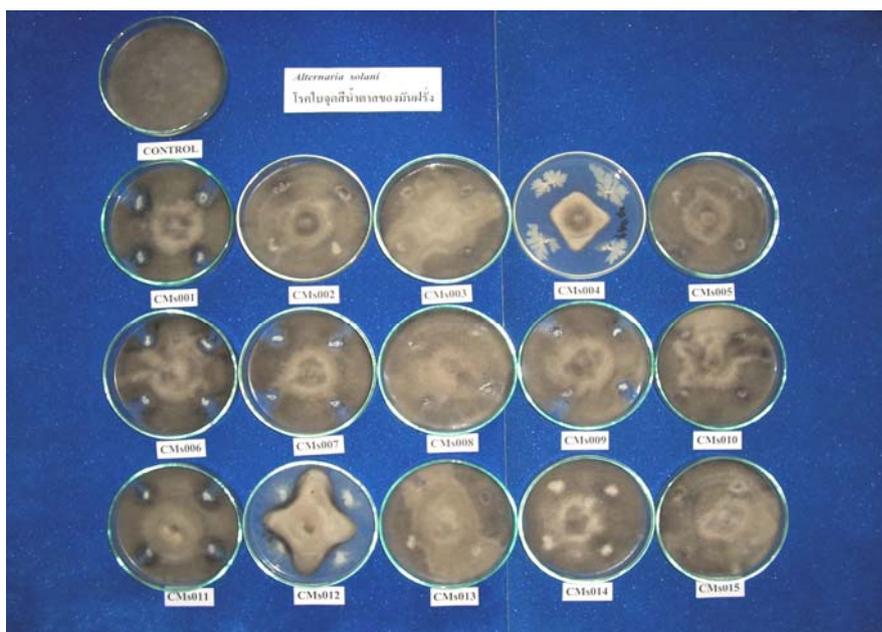
ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Percentage of inhibition					
Chiangmai	Chiangrai	Lumphun	Lampang	Payao	Tak
CMI026=39.5	CRI026=17.2	LPOI026=6.2	LPAI026=8.3	PAOI026=20.5	TKI026=8.1
CMI027=2.5	CRI027=6.9	LPOI027=11.1	LPAI027=5.5	PAOI027=7.2	TKI027=79.8
CMI028=5.8	CRI028=7.7	LPOI028=7.2	LPAI028=5.5	PAOI028=11.9	TKI028=77.7
CMI029=43.8	CRI029=20.8	LPOI029=13.1	LPAI029=14.8	PAOI029=13.8	TKI029=4.1
CMI030=34.5	CRI030=11.9	LPOI030=4.0	LPAI030=0	PAOI030=5.5	TKI030=4.4
CMI031=38.3	CRI031=4.7	LPOI031=0	LPAI031=4.4	PAOI031=5.1	TKI031=60.5
CMI032=44.9	CRI032=17.9	LPOI032=0	LPAI032=5.5	PAOI032=7.0	TKI032=0
CMI033=0	CRI033=5.5	LPOI033=0	LPAI033=50.5	PAOI033=5.0	TKI033=4.7
CMI034=6.5	CRI034=11.2	LPOI034=11.1	LPAI034=19.4	PAOI034=13.3	TKI034=76.1
CMI035=9.7	CRI035=9.7	LPOI035=49.7	LPAI035=22.2	PAOI035=19.5	TKI035=74.1
CMI036=4.6	CRI036=3.3	LPOI036=0	LPAI036=5.5		TKI036=79.1
CMI037=29.1	CRI037=5.5	LPOI037=5.5	LPAI037=5.0		TKI037=79.3
	CRI038=6.2				TKI038=77.9
	CRI039=5.5				TKI039=77.3
	CRI040=16.3				TKI040=77.3
	CRI041=6.3				TKI041=79.5
	CRI042=6.5				TKI042=75.9
	CRI043=7.3				TKI043=2.2
	CRI044=30.4				TKI044=0
	CRI045=2.2				TKI045=1.1
					TKI046=0
					TKI047=0

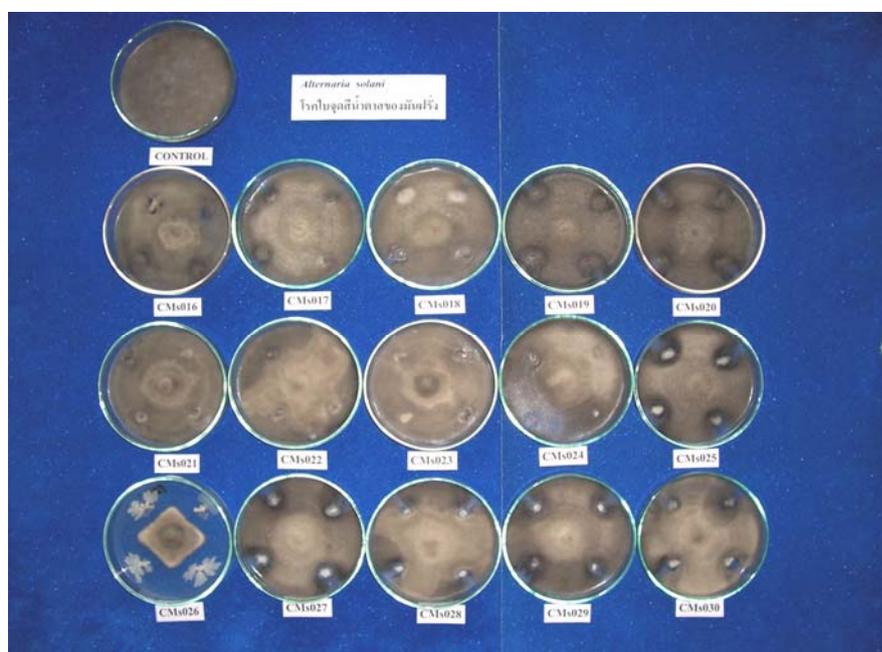
หมายเหตุ CMI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดเชียงใหม่ CRI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดเชียงราย LPOI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดลำพูน LPAI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดลำปาง PAOI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดพะเยา TKI = แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่งจังหวัดตาก

ตารางผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

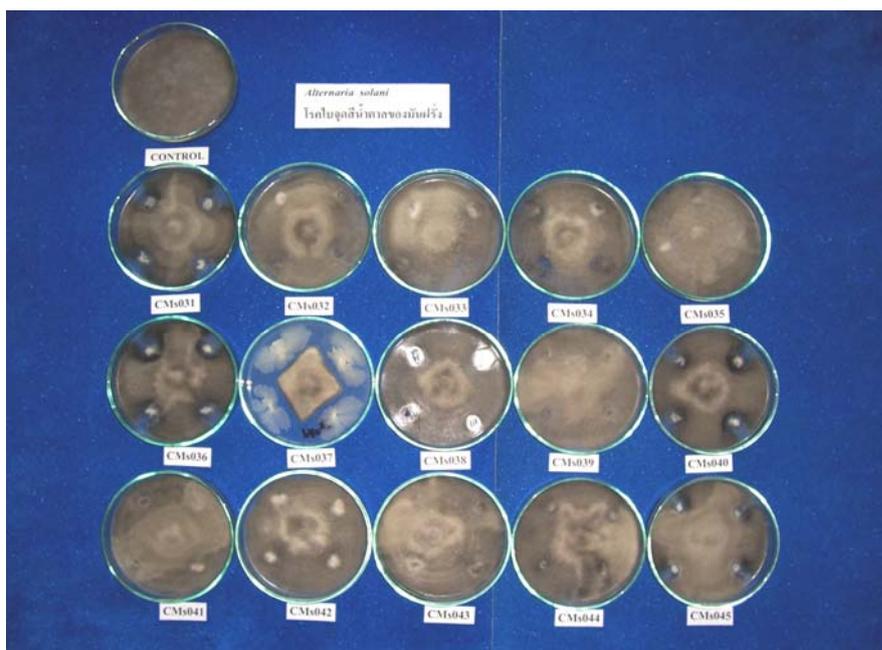
Isolate	Concentration level of antagonistic bacteria					
	1%	1.5%	2%	2.5%	3%	5%
1. CMs004	53.48	56.53	52	61.1	60.34	67.38
2. CMs012	54.30	59.60	67.25	64.73	67.93	71.80
3. CMs026	58.88	63.30	69.25	69.73	72.08	78.45
4. CMs037	0	0	0	0	0	0
5. CRs011	57.35	57.53	59.75	60.15	63.48	71.95
6. CRs012	48.63	60.53	66.53	67.65	65.55	74.45
7. CRs022	29.45	54.00	57.65	68.20	71.40	76.00
8. LPOs014	0	0	0	0	0	0
9. LPOs024	27.90	35.00	27.40	58.75	48.50	60.13
10. LPOs042	25.53	10.25	21.48	7.78	16.25	8.0
11. LPAAs014	34.30	42.00	46.38	47.38	66.95	53.63
12. LPAAs016	36.80	44.75	52.78	65.98	65.30	70.40
13. LPAAs043	75.00	58.75	77.78	76.40	63.75	76.55
14. PAOs001	69.45	70.50	80.40	79.85	79.05	84.6
15. PAOs022	3.75	9.00	16.95	26.55	39.30	47.75
16. PAOs024	47.65	56.00	59.85	74.23	66.25	80.00
17. PAOs028	58.75	68.33	73.60	79.83	65.55	71.95
18. PAOs030	51.70	58.25	50.28	64.18	68.78	69.73
19. PAOs044	55.80	62.25	64.15	69.33	73.75	72.78
20. TKs044	45.83	64.25	55.70	64.03	67.88	67.35
21. TKs046	62.35	64.72	67.35	70.00	72.90	75.53
22. TKI016	53.90	71.55	65.15	67.35	70.95	70.00
สารเคมี (benomyl)		1,000ppm		1,500ppm		2,000ppm
		45.10		53.05		62.50



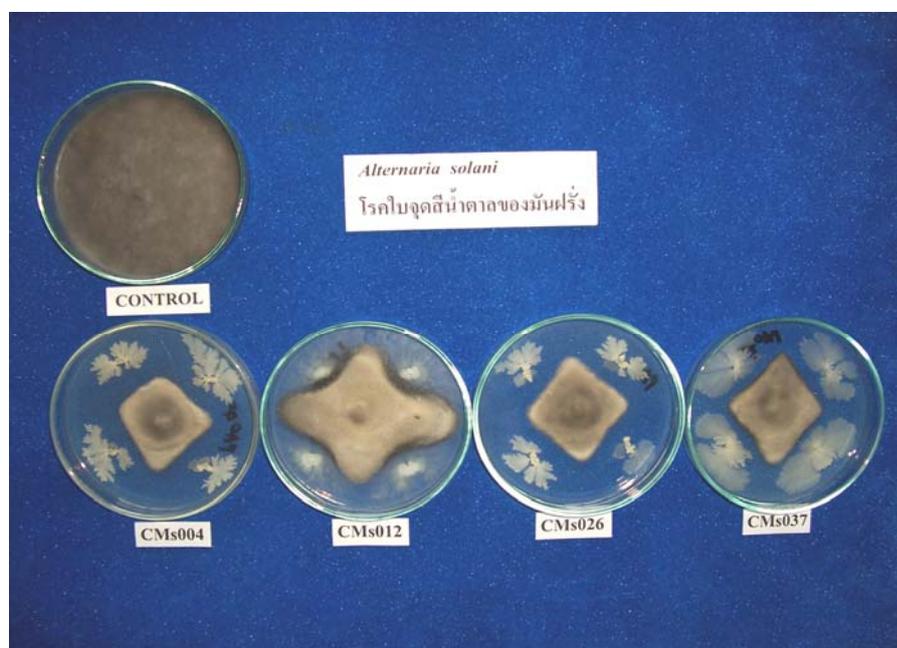
ภาพผนวกที่ 1 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



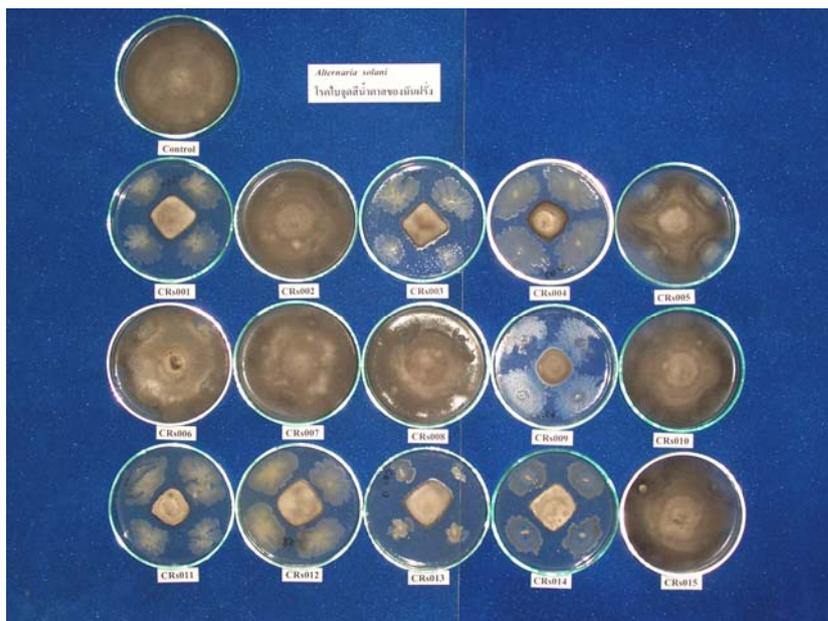
ภาพผนวกที่ 2 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลท CMs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternari solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



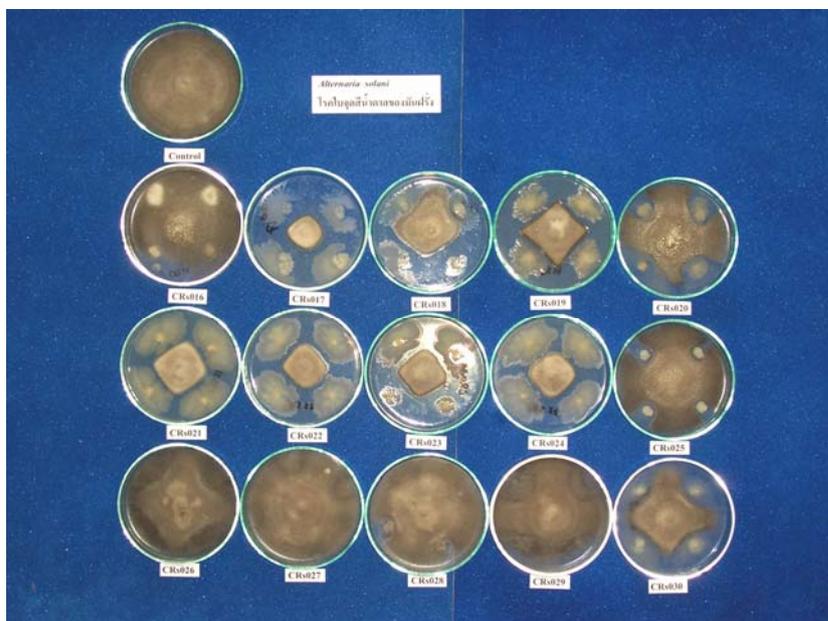
ภาพผนวกที่ 3 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลต CMs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมัสฝรั่ง



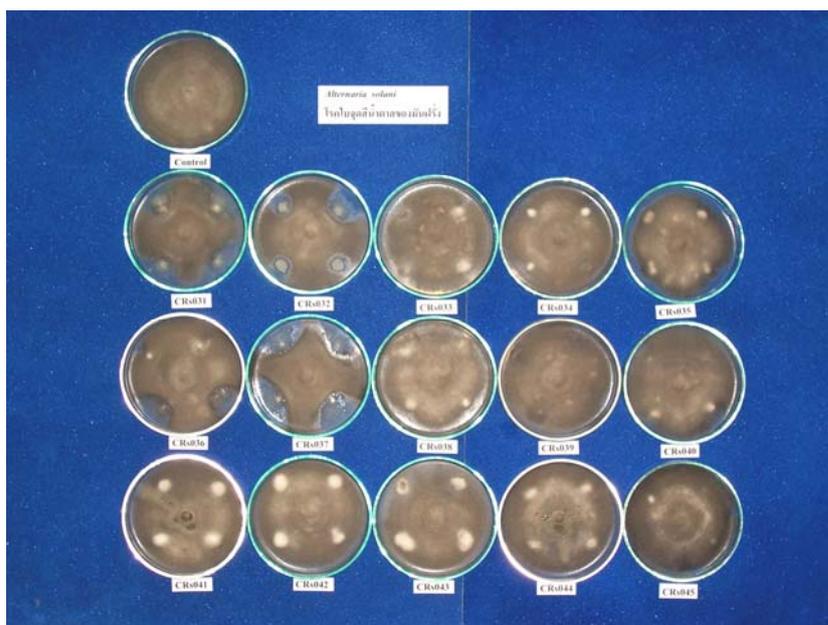
ภาพผนวกที่ 4 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลต CMs004, 012, 026 และ 037) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมัสฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 5 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคราน้ำค้างของมะพร้าว



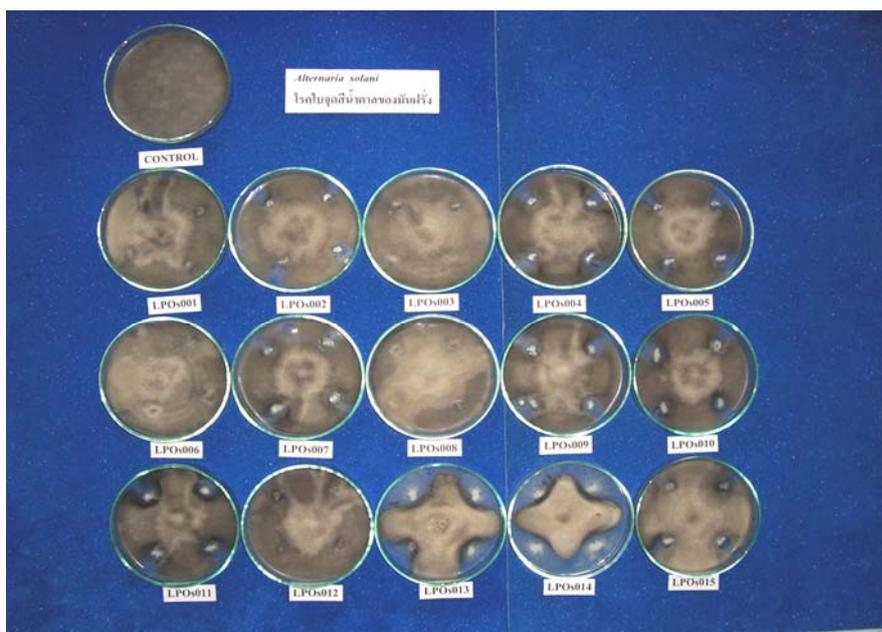
ภาพผนวกที่ 6 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคราน้ำค้างของมะพร้าว



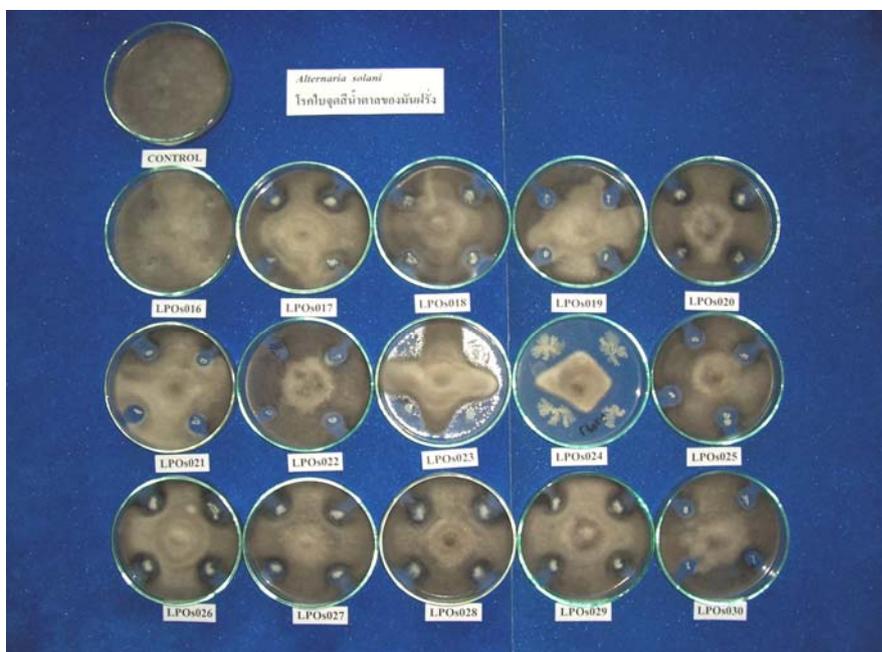
ภาพผนวกที่ 7 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



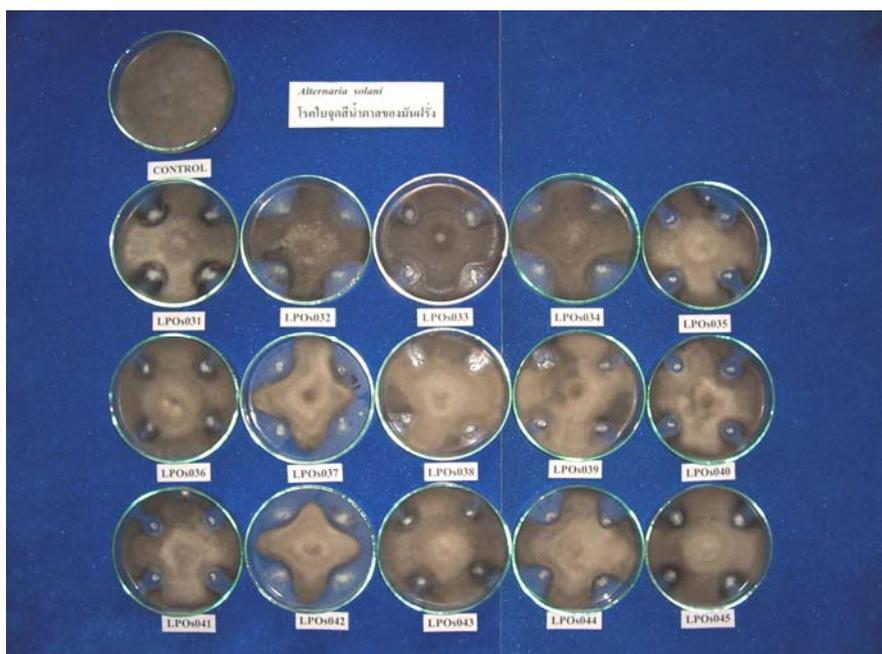
ภาพผนวกที่ 8 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRs011, 012 และ 022) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



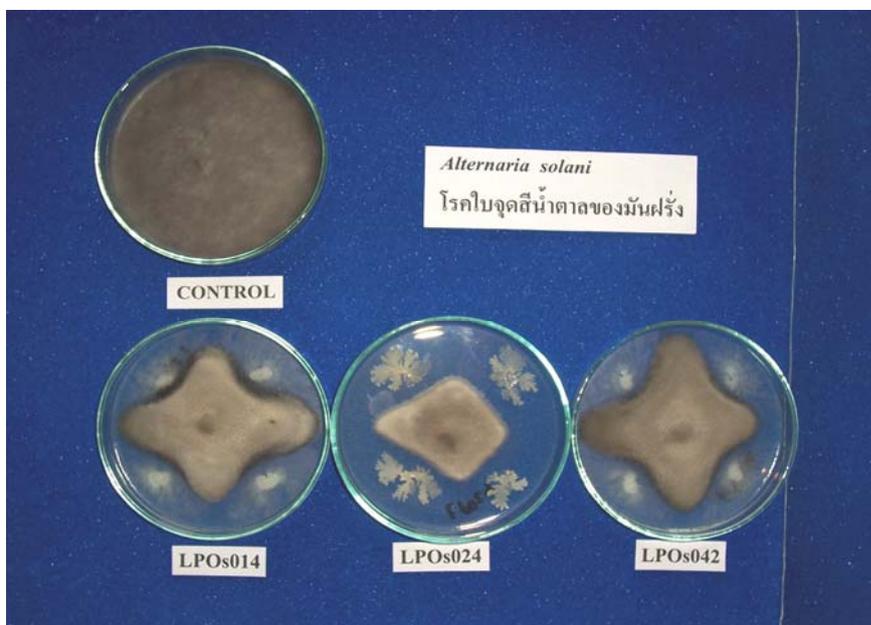
ภาพผนวกที่ 9 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 10 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



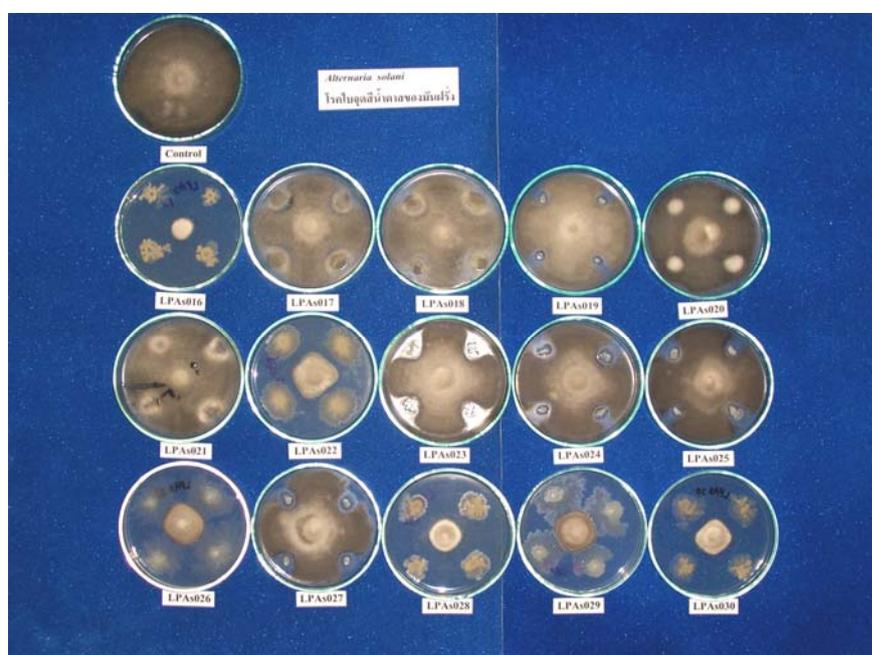
ภาพผนวกที่ 11 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



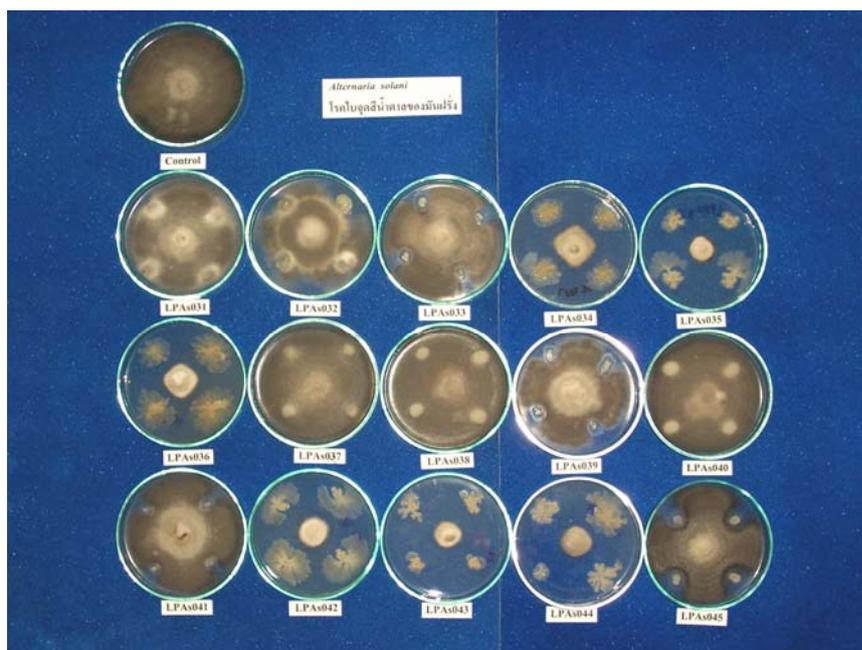
ภาพผนวกที่ 12 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOs014, 024 และ 042) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



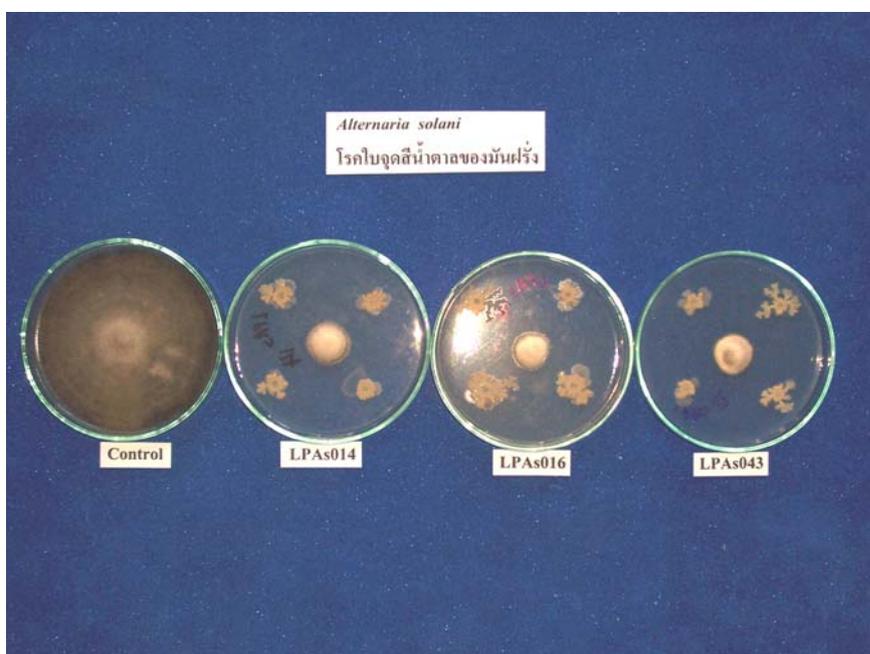
ภาพผนวกที่ 13 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPA001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 14 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPA016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



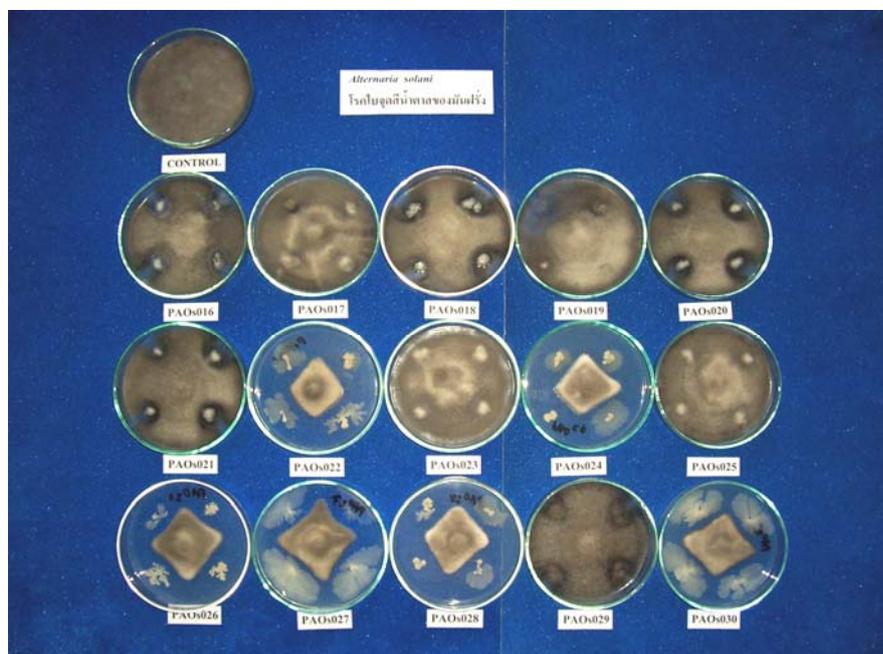
ภาพผนวกที่ 15 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลต LPAs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



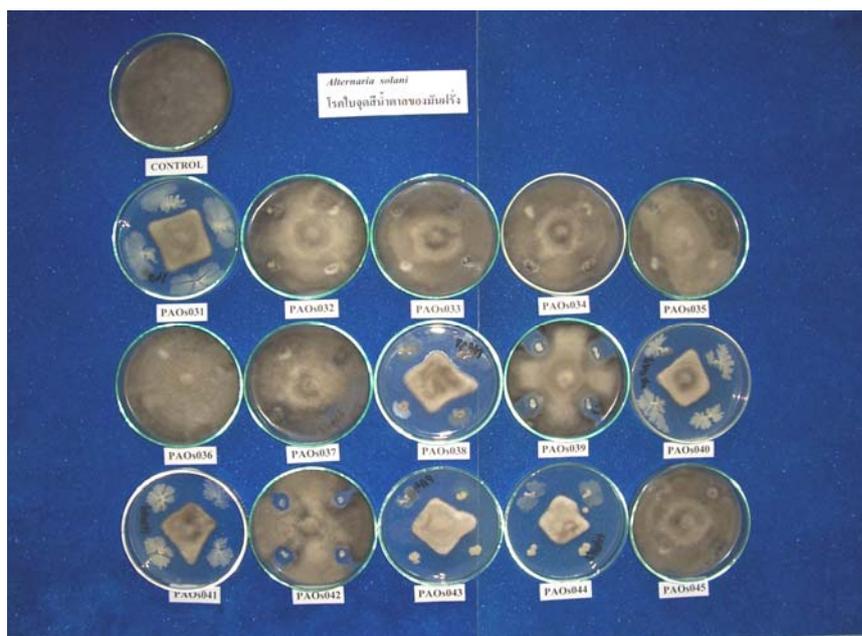
ภาพผนวกที่ 16 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลต LPAs014, 016 และ 043) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



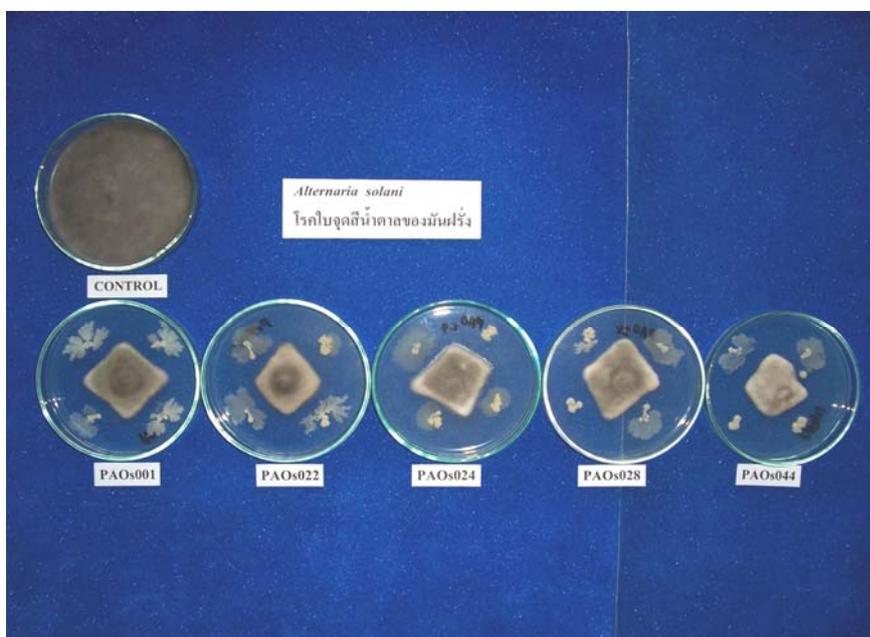
ภาพผนวกที่ 17 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



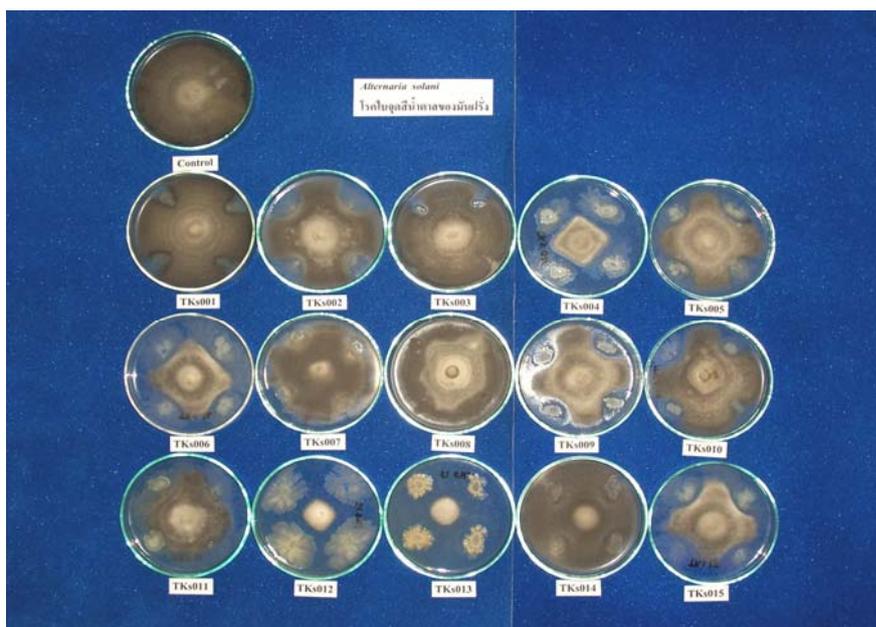
ภาพผนวกที่ 18 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 19 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



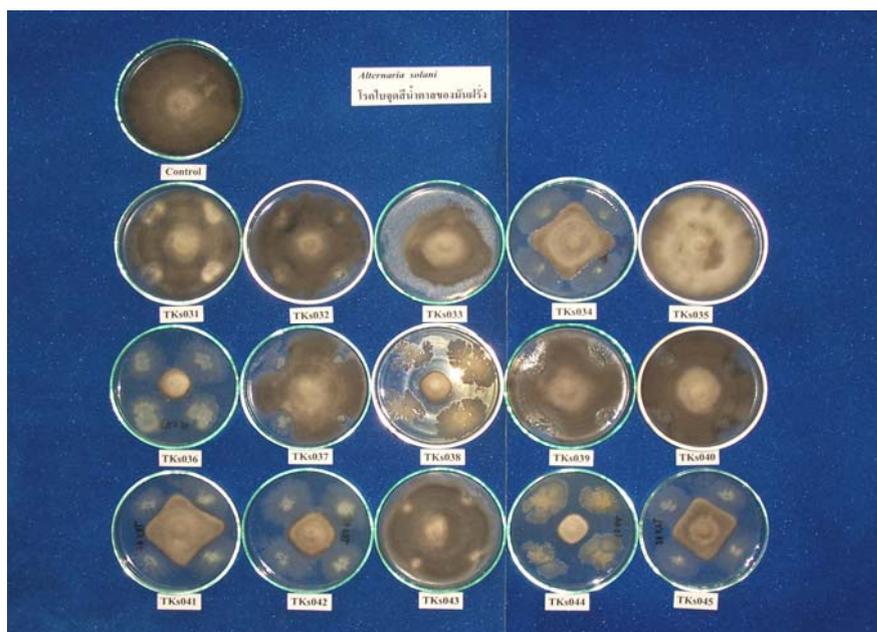
ภาพผนวกที่ 20 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOs001, 022, 024, 028 และ 044) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



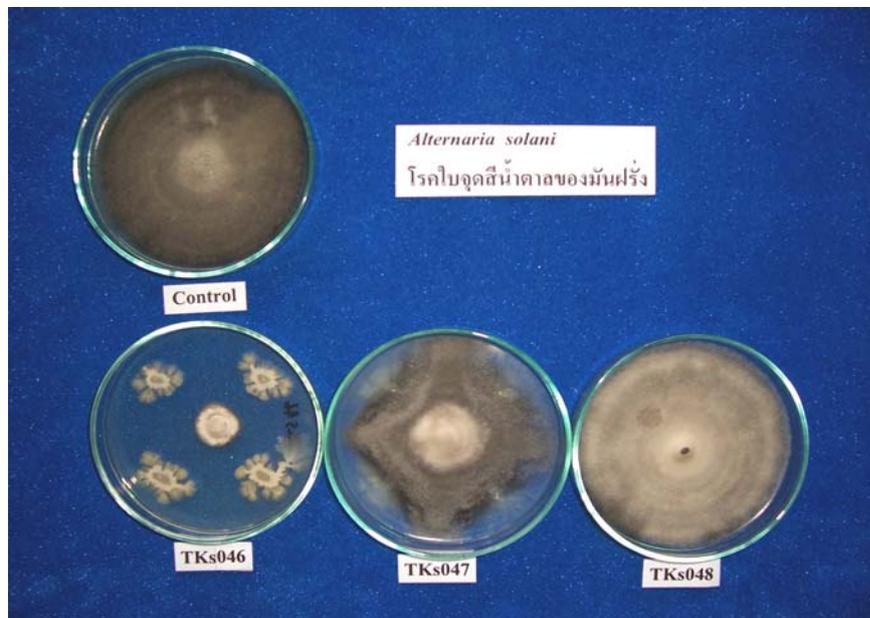
ภาพผนวกที่ 21 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 22 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



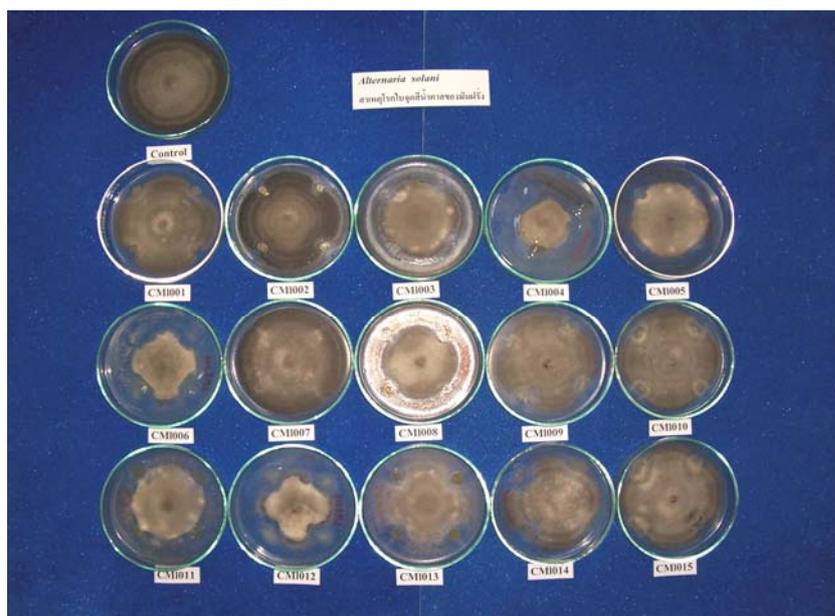
ภาพผนวกที่ 23 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคโน้ดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



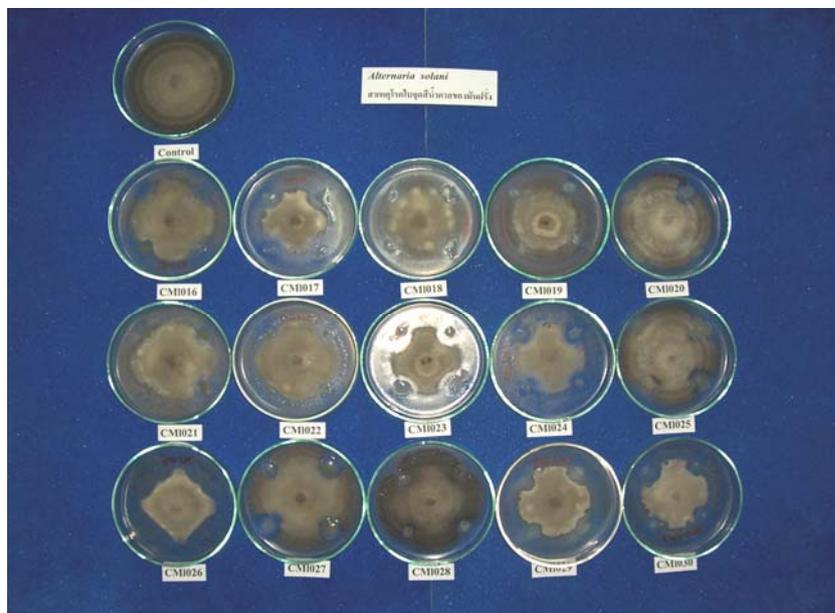
ภาพผนวกที่ 24 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs046-048) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคโน้ดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 25 แบคทีเรียจากดินในแปลงปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TKs013, 044 และ 046) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



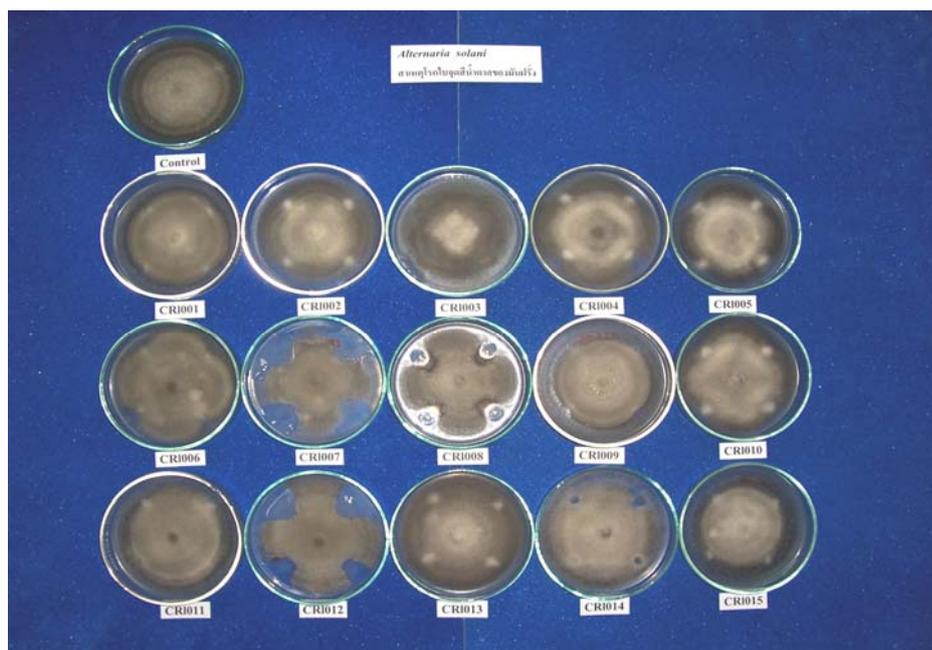
ภาพผนวกที่ 26 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลต CMI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



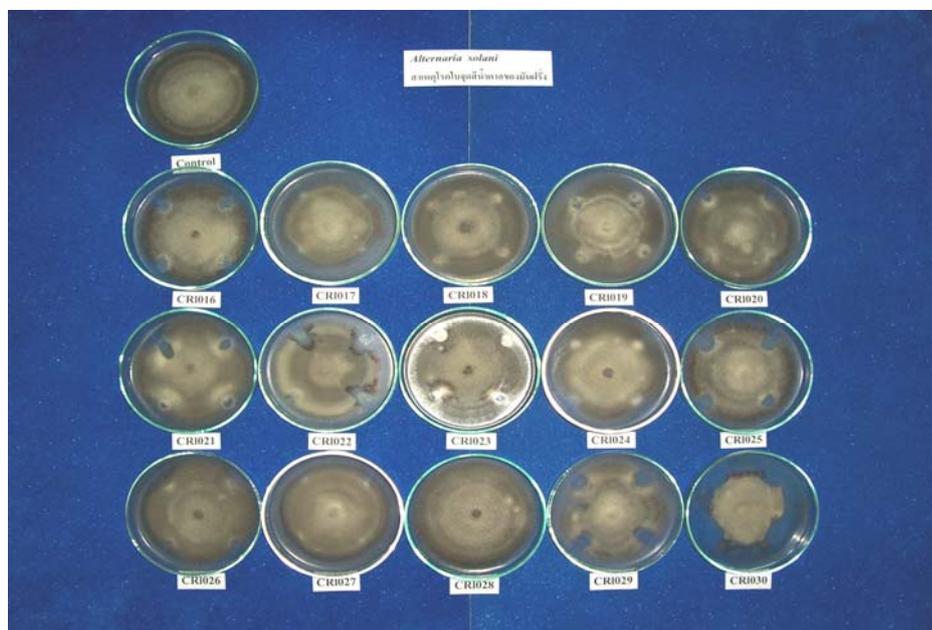
ภาพผนวกที่ 27 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลต CMI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



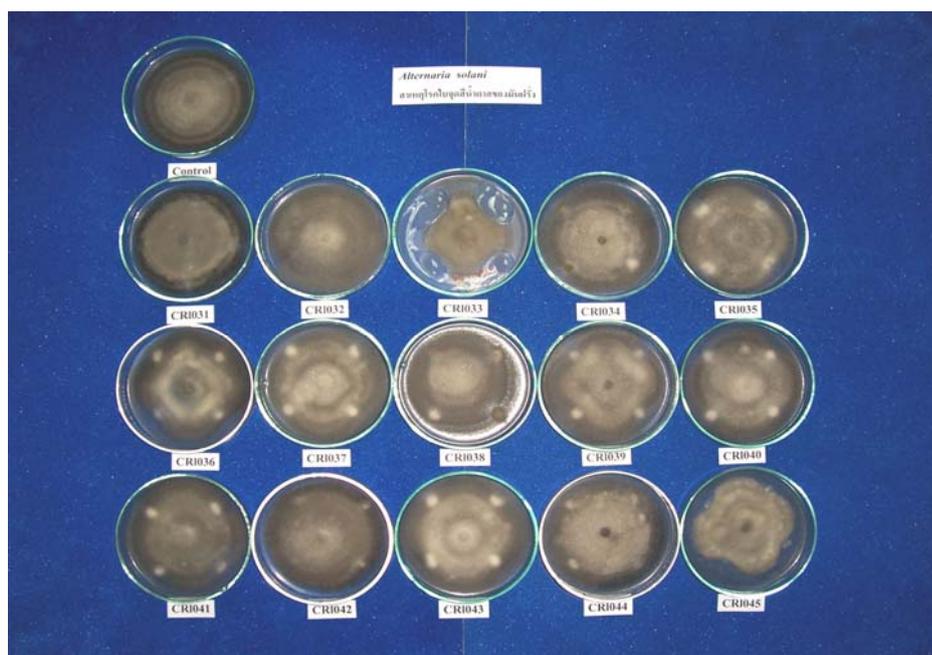
ภาพผนวกที่ 28 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ (ไอโซเลต CMI031-037) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



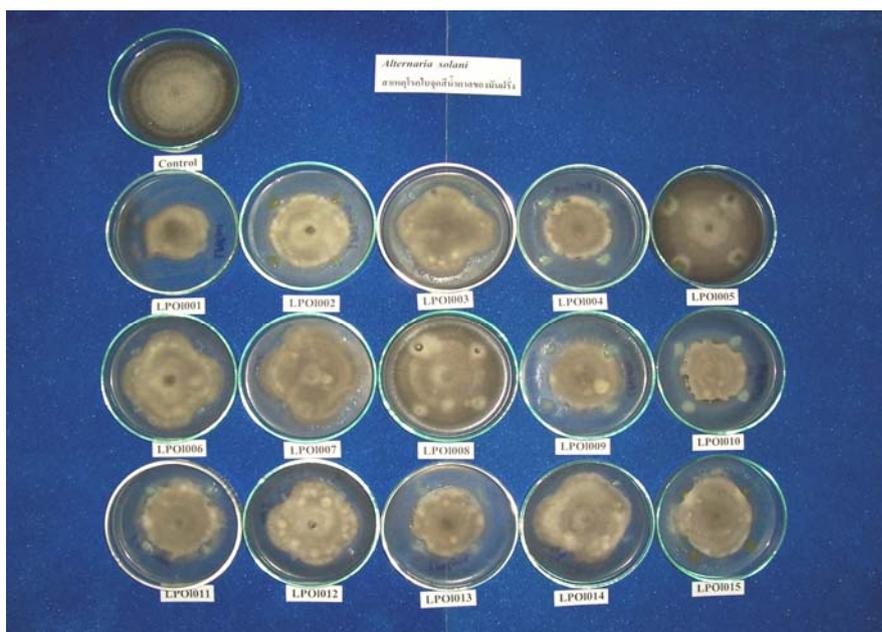
ภาพผนวกที่ 29 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



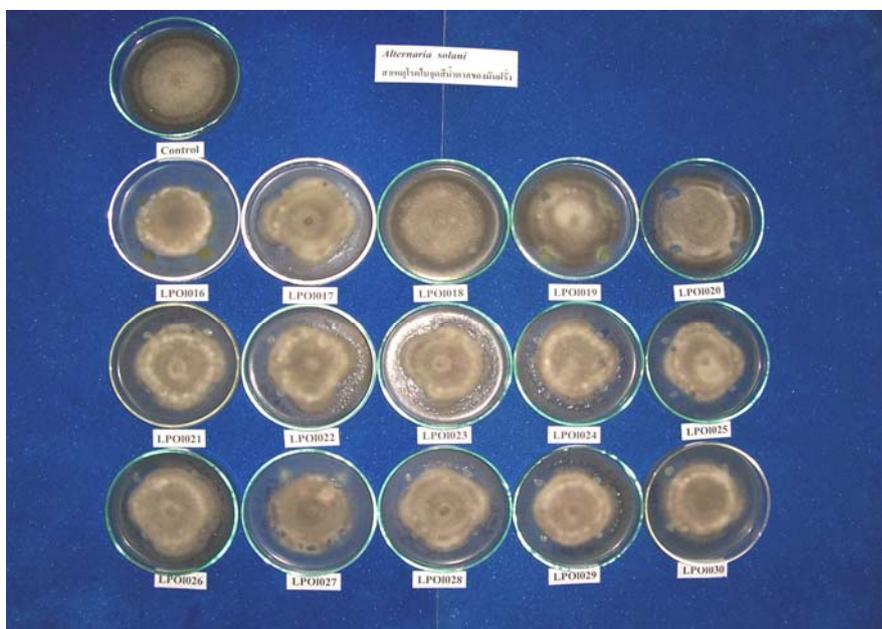
ภาพผนวกที่ 30 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



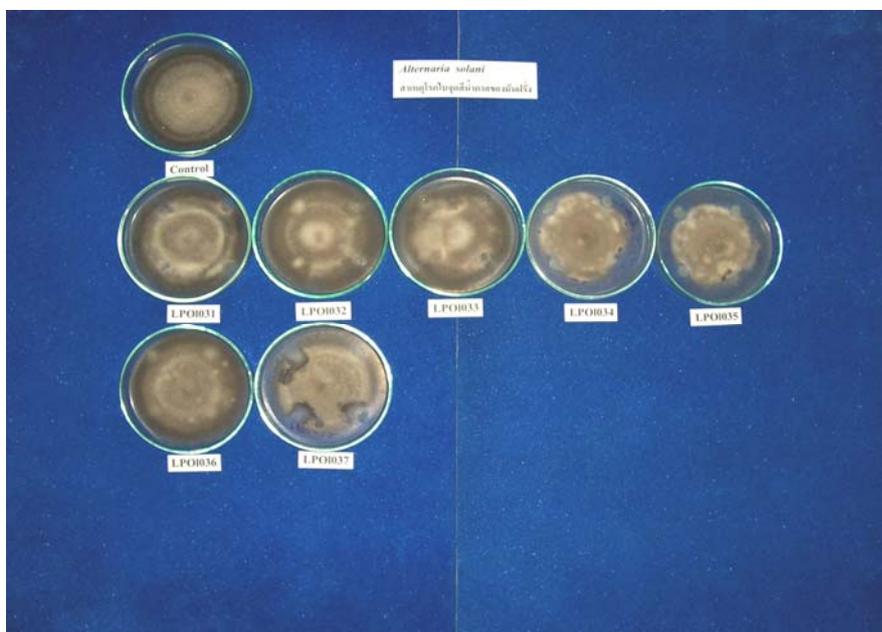
ภาพผนวกที่ 31 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดเชียงราย (ไอโซเลท CRI031-045)
 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer
 สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



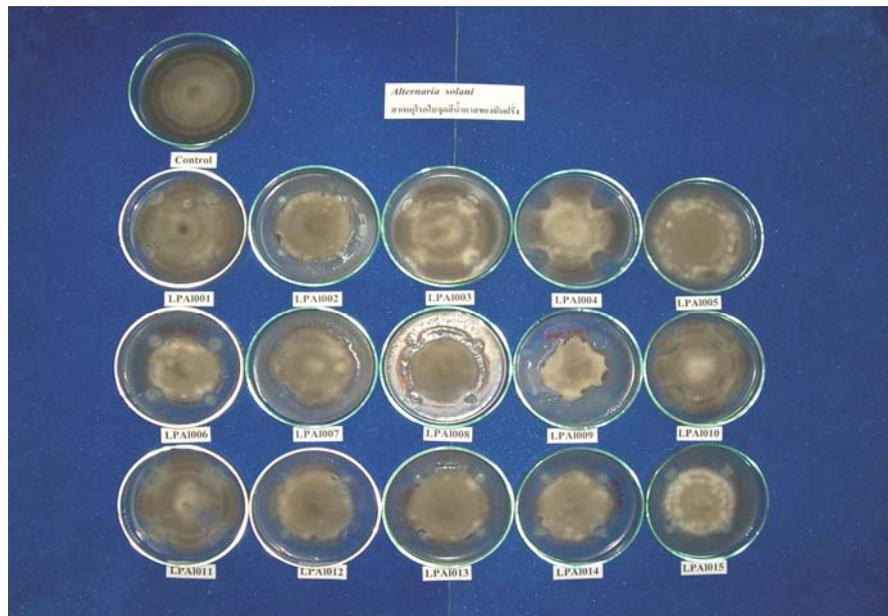
ภาพผนวกที่ 32 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



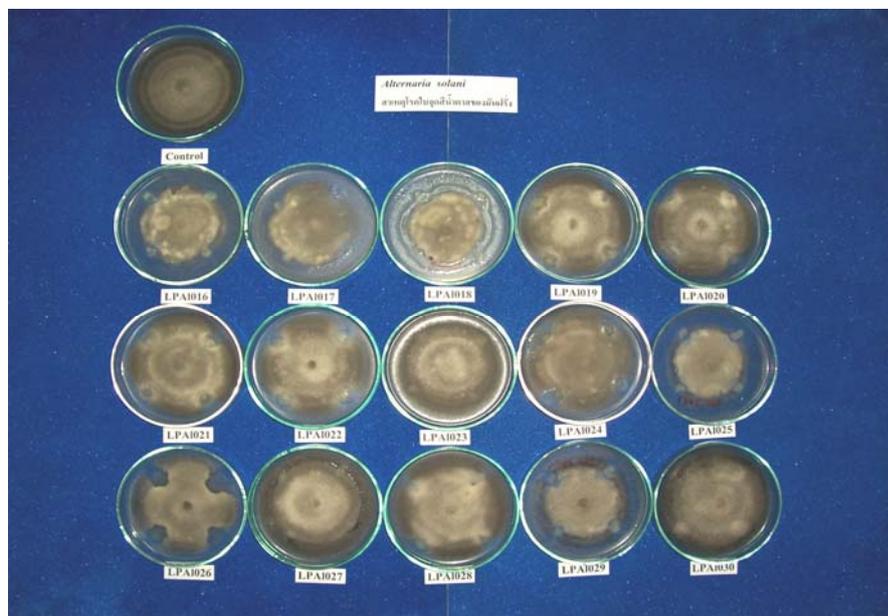
ภาพผนวกที่ 33 แบบที่เรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



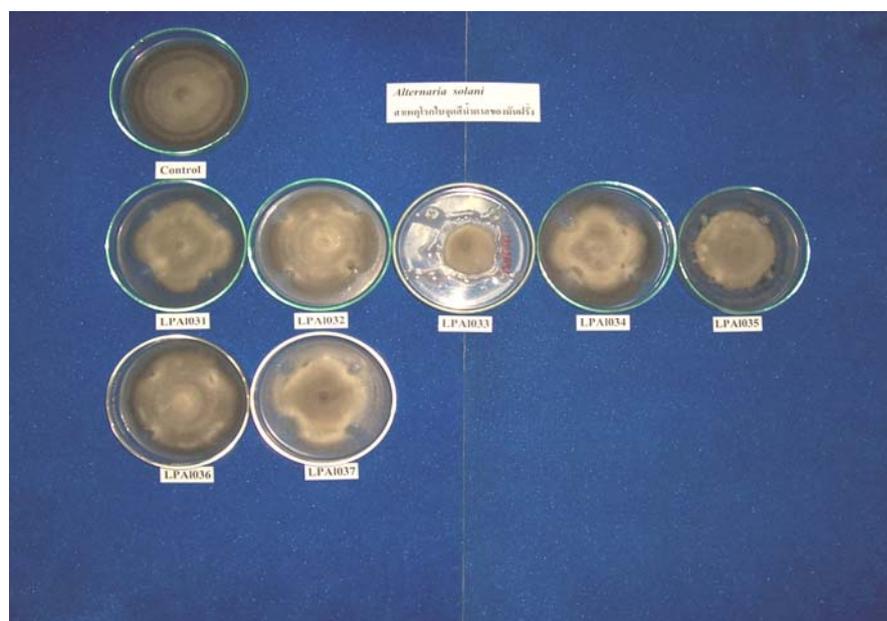
ภาพผนวกที่ 34 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำพูน (ไอโซเลท LPOI031-037)
 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer
 สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



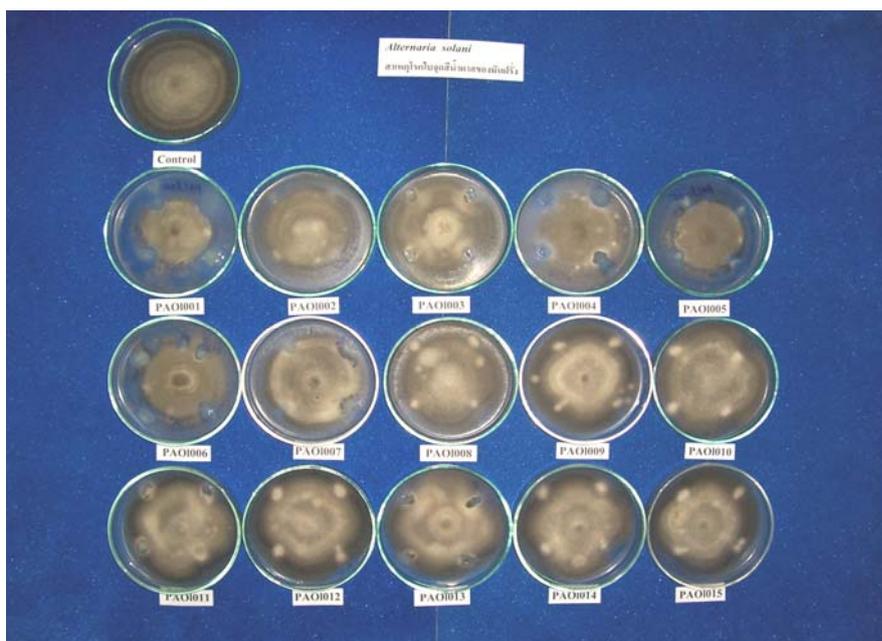
ภาพผนวกที่ 35 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPA1001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



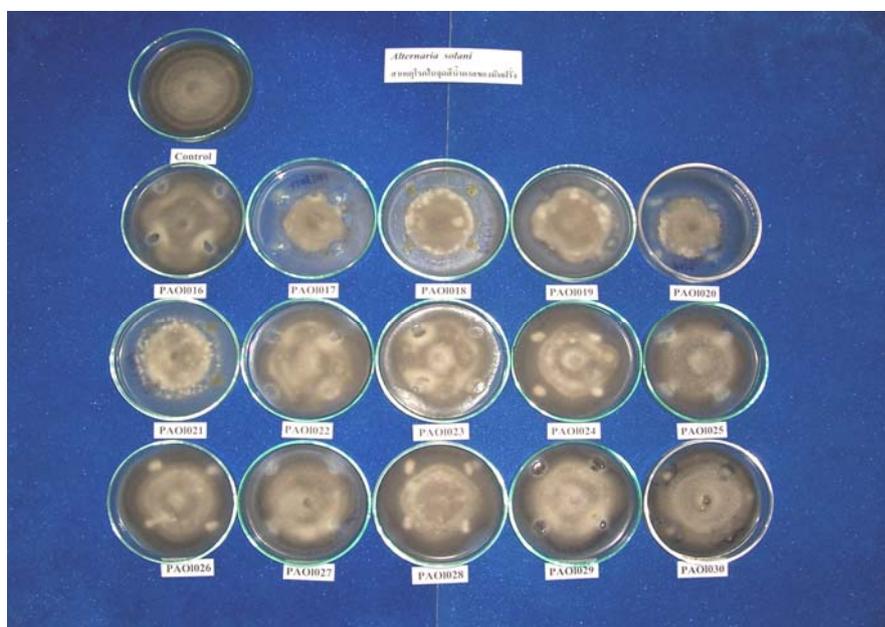
ภาพผนวกที่ 36 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPA1016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



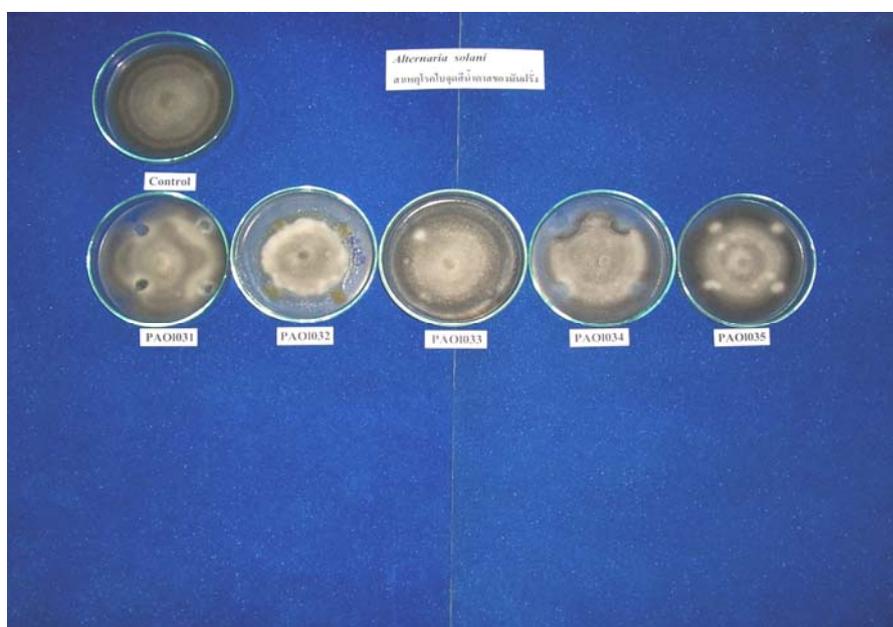
ภาพผนวกที่ 37 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดลำปาง (ไอโซเลท LPAI031-037)
ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



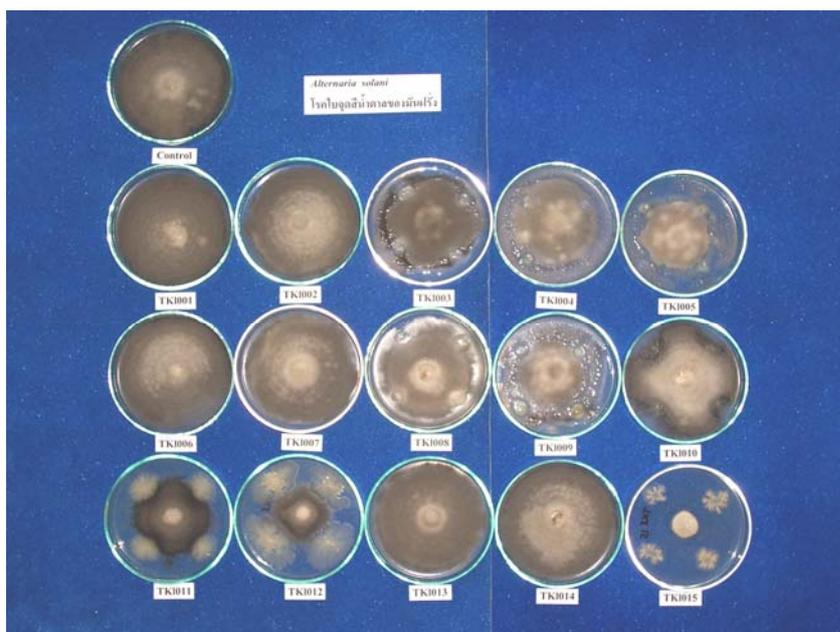
ภาพผนวกที่ 38 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAO1001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 39 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAO1016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



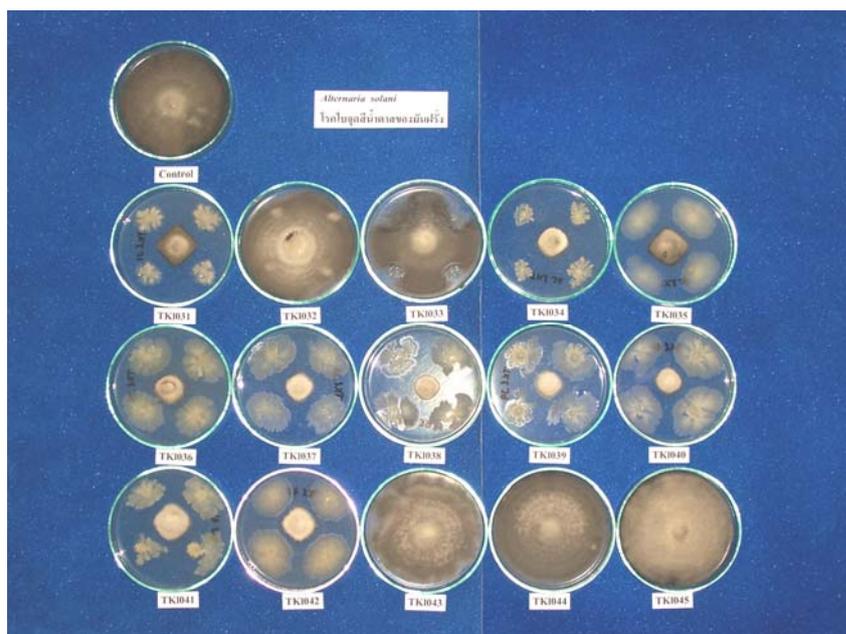
ภาพผนวกที่ 40 แบคทีเรียจากผิวไบโอมันฝรั่ง จังหวัดพะเยา (ไอโซเลท PAOI031-035)
ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer
สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



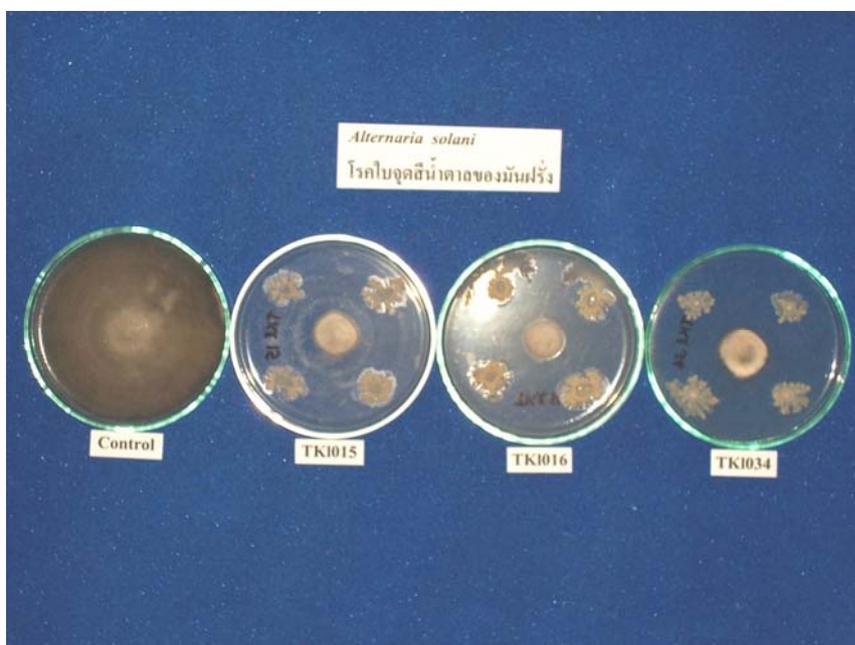
ภาพผนวกที่ 41 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TK1001-015) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง



ภาพผนวกที่ 42 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท PAO1016-030) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

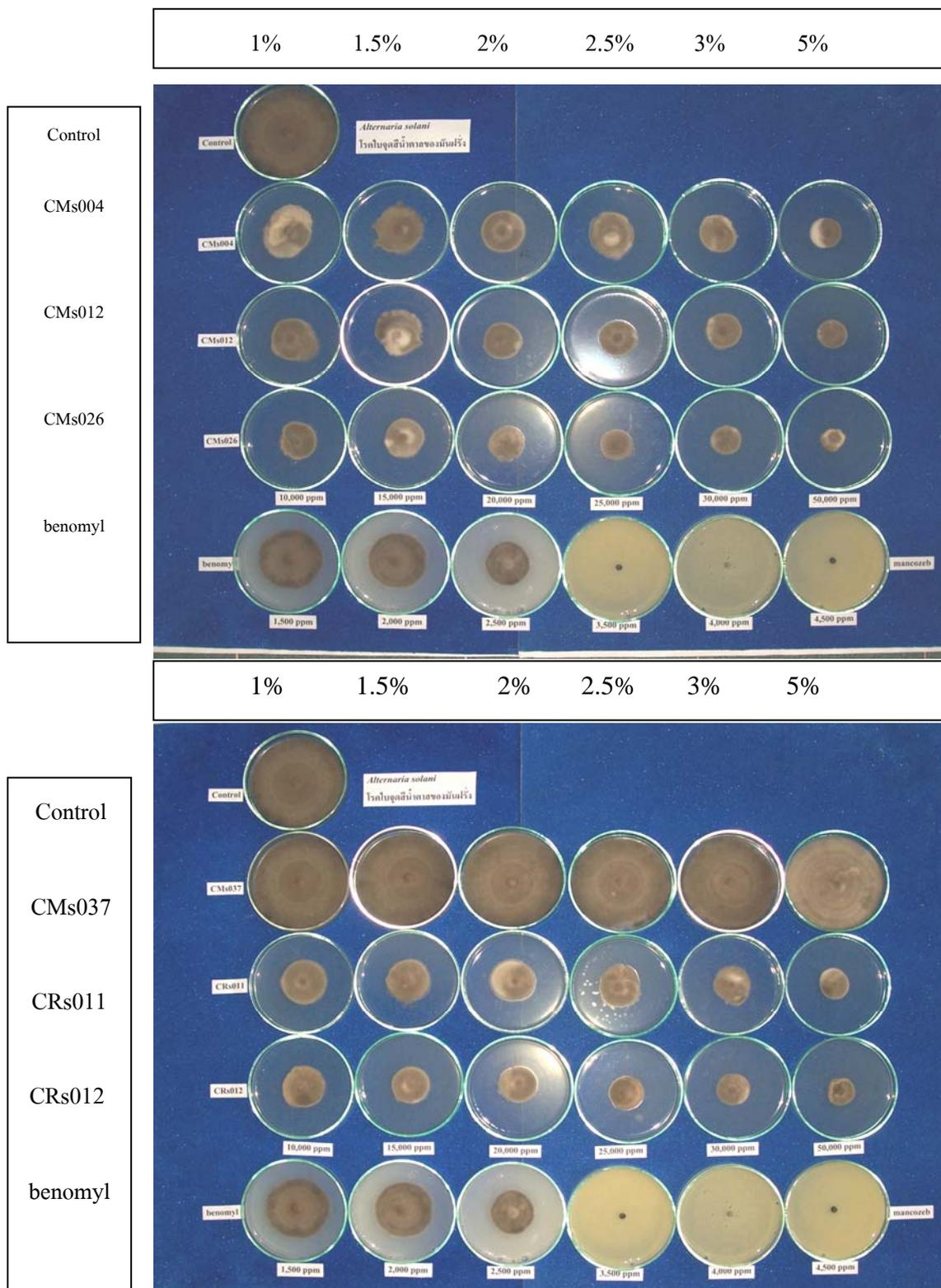


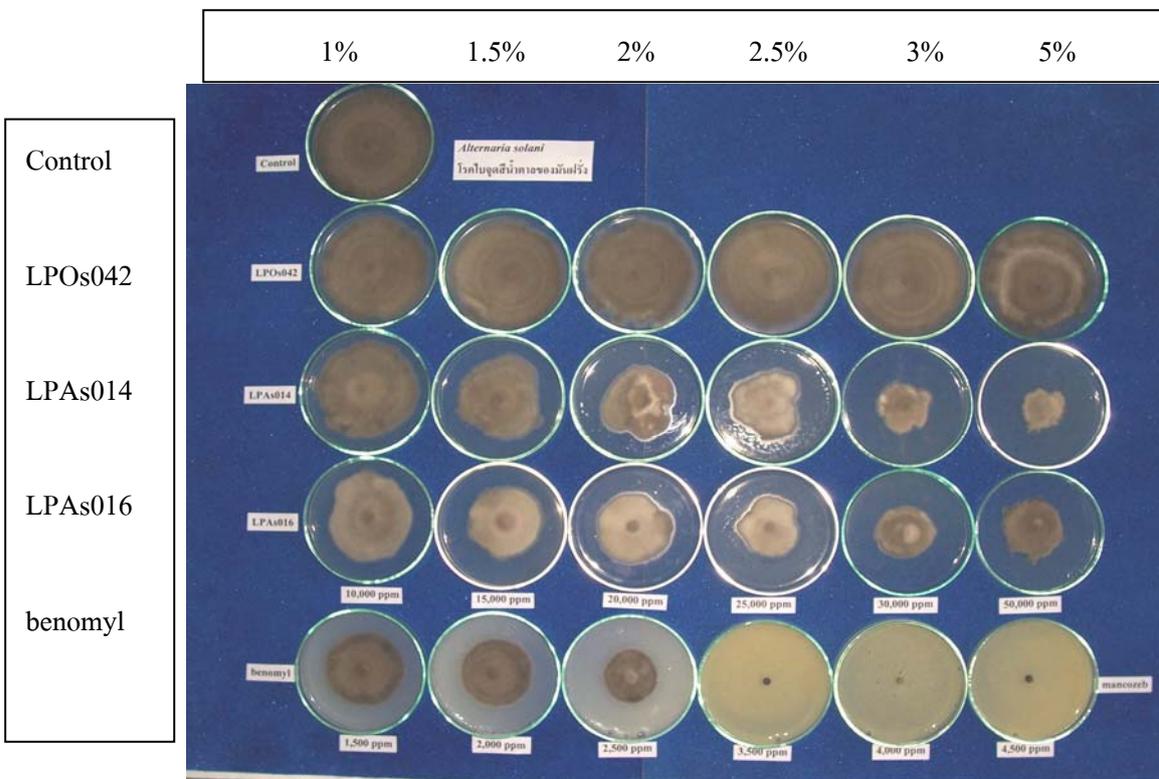
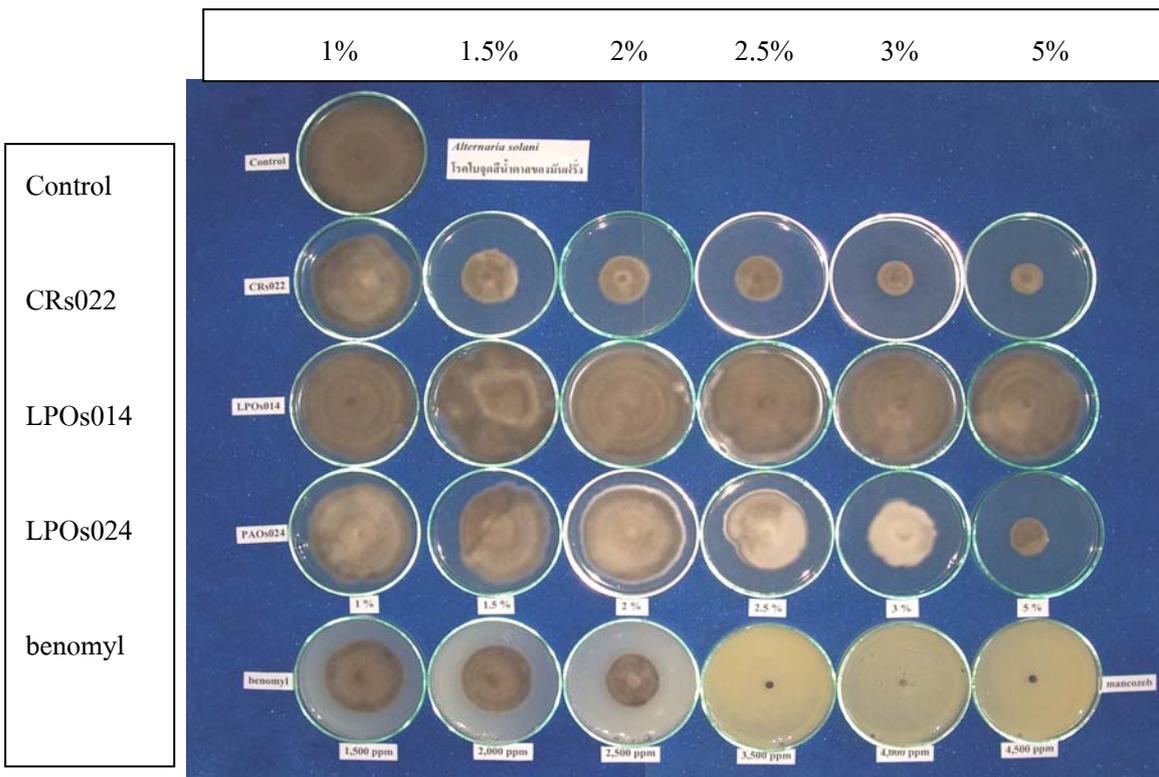
ภาพผนวกที่ 43 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TK1031-045) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

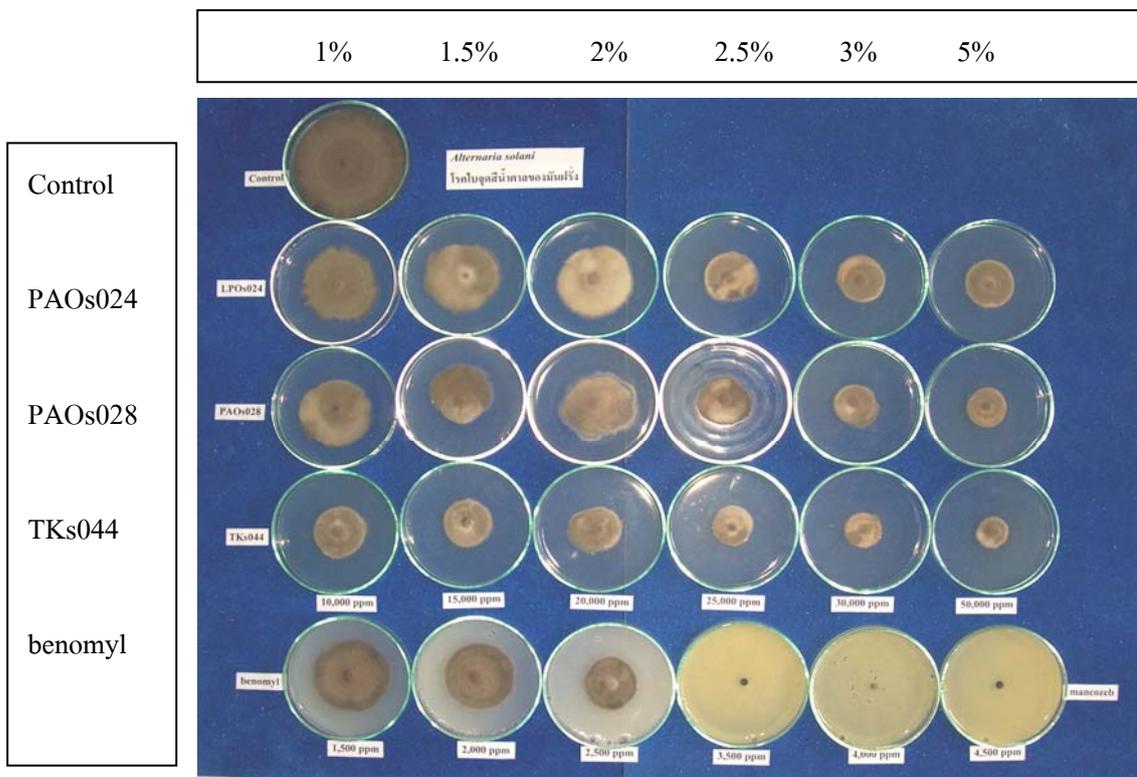
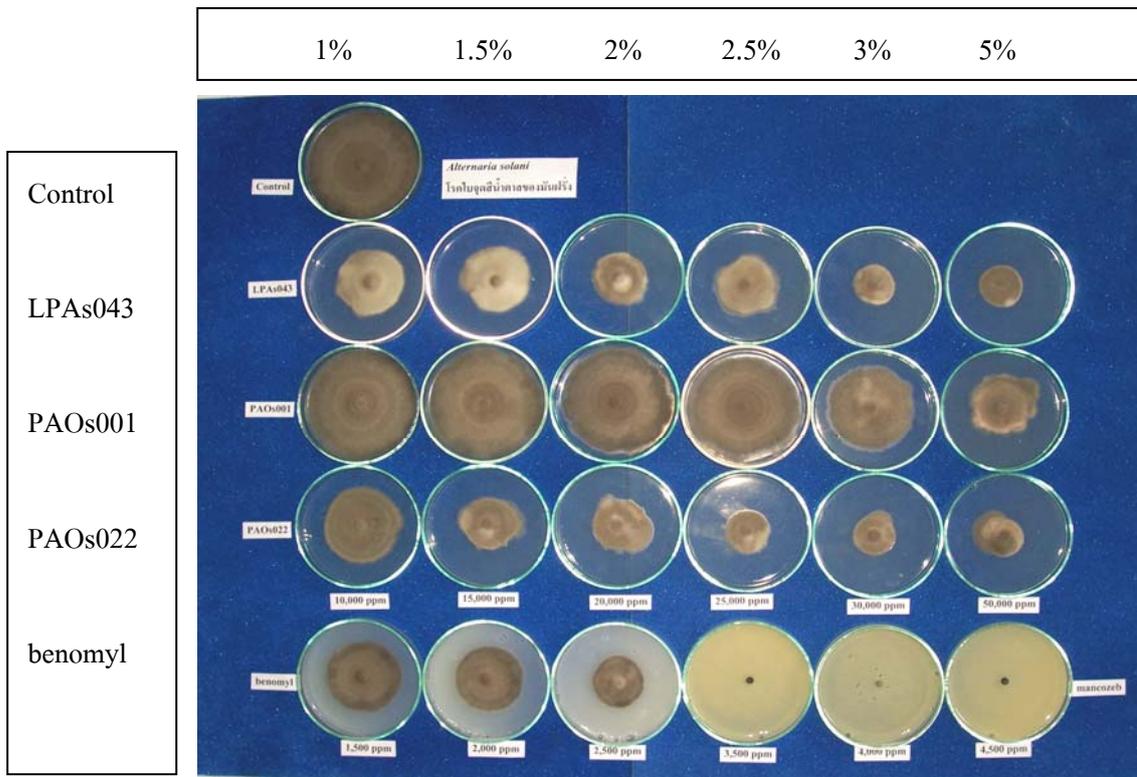


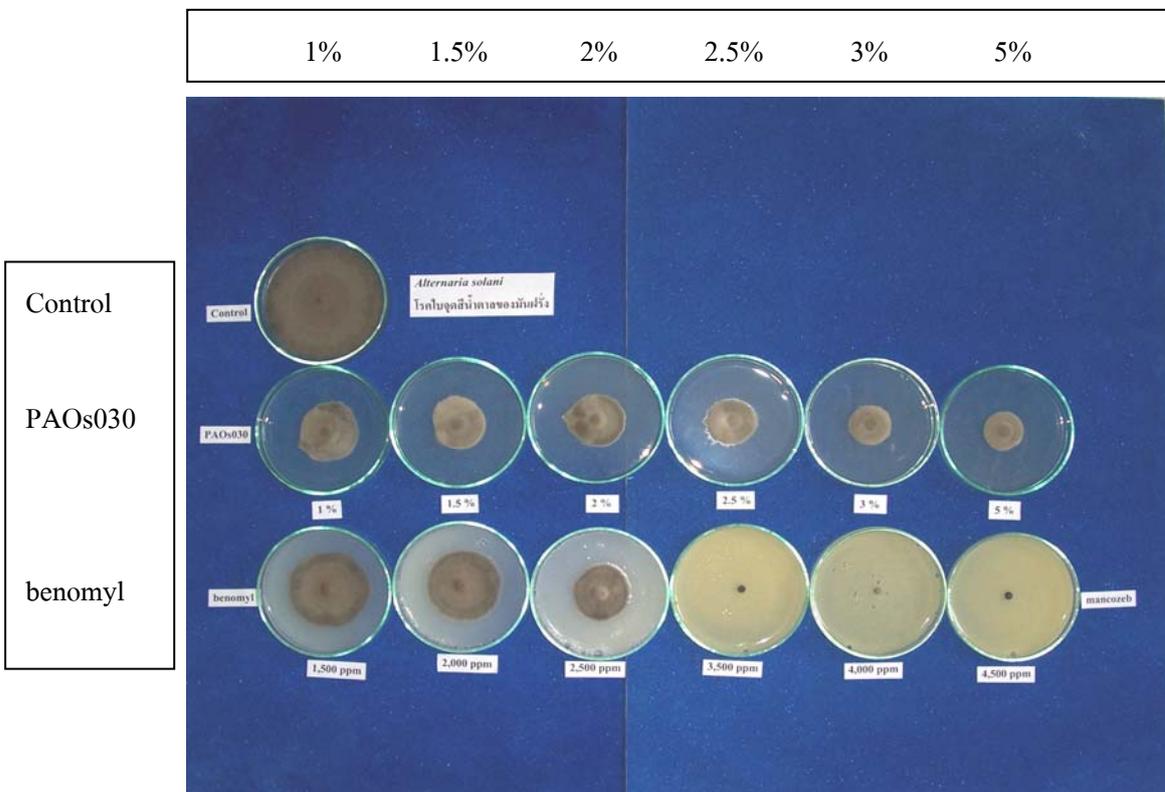
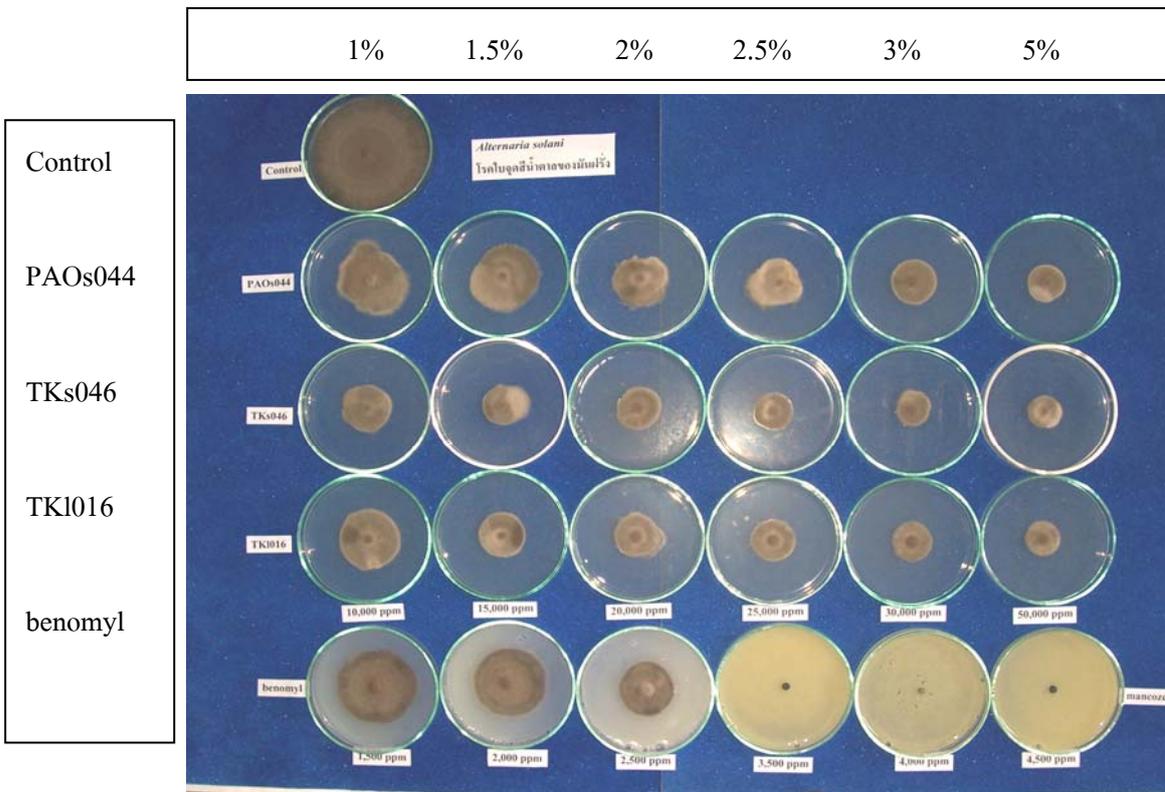
ภาพผนวกที่ 44 แบคทีเรียจากผิวใบมันฝรั่ง จังหวัดตาก (ไอโซเลท TK1015, 016 และ 034) ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง

ภาพผนวกที่ 45 สารทุติยภูมิจากแบคทีเรียปฏิบั้กษ์ จำนวน 22 ไอโซเลท
 ในการยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria solani* Sorauer สาเหตุโรค
 ใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่ง









รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044



รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. Characteristics of the bacterial strain CMS 026 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
- glycerol	+
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- β-methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D – glucose	+
- D – fructose	+
- D – mannose	+
- L – sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- mannitol	+
- sorbitol	+
- α-methyl-D-mannoside	-
- α-methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdaline	+
- arbutine	+

Remark : +ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ๓๕ หมู่ ๓ ตำบลในธานี ศ.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๔๔๙ ๙๐๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๔๔๙ ๙๐๐๙
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th



รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. (continued) Characteristics of the bacterial strain CMS 026 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
- esculine	+
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	+
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	-
- melezitose	-
- D-raffinose	+
- starch	+
- glycogene	+
- xylitol	-
- β-gentiobiose	+
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	-
- 2-keto-gluconate	-
- 5-keto-gluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ๓๕ หมู่ ๓ ถนนพหลโยธิน ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๔๗ ๙๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๔๗ ๙๐๐๙
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th



ว.จ.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. (continued) Characteristics of the bacterial strain CMS 026 : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
β -galactosidase production (ortho-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside)	-
Arginine dihydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	-
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	+
Hydrolysis of gelatin	+
Reduction of nitrate	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก ว.จ.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ๓๕ หมู่ ๓ เขตในธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๔๗๗ ๕๐๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๔๗๗ ๕๐๐๕
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th



ว.จ.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. Characteristics of the bacterial PAOs44 : *Bacillus* sp.

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from :	
- glycerol	-
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	-
- ribose	-
- D-xylose	-
- L-xylose	-
- adonitol	-
- β-methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D - glucose	+
- D - fructose	+
- D - mannose	+
- L - sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- mannitol	-
- sorbitol	-
- α-methyl-D-mannoside	-
- α-methyl-D-glucoside	-
- N-acetyl-glucosamine	-
- amygdaline	-
- arbutine	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก ว.จ.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

๓๕ หมู่ ๓ เขตในธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๓๗ ๕๐๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๓๗ ๕๐๐๕
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th



ว.จ.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. (continued) Characteristics of the bacterial PAOs44 : *Bacillus* sp.

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from : (continued)	
- esculine	+
- salicine	-
- cellobiose	+
- maltose	-
- lactose	-
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	-
- inuline	-
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	-
- glycogene	-
- xylitol	-
- β-gentiobiose	-
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	-
- 2-keto-gluconate	-
- 5-keto-gluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก ว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ๓๕ หมู่ ๓ เขตในธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๓๗ ๙๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๓๗ ๙๐๐๙
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th



วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. (continued) Characteristics of the bacterial PAOs44 : *Bacillus* sp.

Characteristics	Reaction
β -galactosidase production (ortho-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside)	-
Arginine dihydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	-
Ornithine decarboxylase production	-
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase production	-
Indole production of tryptophane	-
Acetoin production	+
Hydrolysis of gelatin	+
Reduction of nitrate	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบ / วิเคราะห์เท่านั้น
 ห้ามนำผลการทดสอบ / วิเคราะห์ไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

๓๕ หมู่ ๓ เทศบาลในธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
 โทร. (๖๖) ๐ ๒๕๓๗ ๕๐๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๓๗ ๕๐๐๕
 E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายหฤษฎ์ นิ่มรักษา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 มิถุนายน 2513
สถานที่เกิด	กาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่) คณะเกษตรศาสตร์บางพระ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ประจำตามสัญญา
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ ทุนการศึกษาที่ได้รับ	