การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ของการผลิตลำไยพันธุ์อีดอ (*Dimocarpus longan* Lour.)

จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ของการผลิตลำไยพันธุ์อีดอ (*Dimocarpus longan* Lour.)

จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

APPLICATION OF ANTAGONISTIC BACTERIA FOR FRUIT ROT DISEASE CONTROL *PESTALOTIOPSIS* SP. AND *LASIODIPLODIA* SP. OF LONGAN PRODUCTION (*DIMOCARPUS LONGAN* LOUR.)

JIRAPINYA LIAMKRAITUAN

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Biotechnology
April 2021
Copyright 2020 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ของการผลิตลำไยพันธุ์อีดอ (*Dimocarpus longan* Lour.)

ของ จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

.... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัค มหัทธนพรรค)

.... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร)

.... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

.... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัค มหัทธนพรรค)

.... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญฤทธิ์ สินค้างาม)

เรื่อง: การประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ของการผลิตลำไยพันธุ์อีดอ (*Dimocarpus longan* Lour.)

ผู้วิจัย: จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2563

อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัค มหัทธนพรรค อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร

คำสำคัญ แบคทีเรียปฏิปักษ, โรคผลเน่า, ลำไย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย โดยคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบ และดินบริเวณสวนลำไยได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลท ด้วยวิธี spread plate technique นำไปทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ด้วยวิธี Dual culture plate technique บนอาหาร PDA พบว่า ไอโซเลท S050 มีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. อยู่ที่ 72.67 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท S067 มีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. อยู่ที่ 70.37 เปอร์เซ็นต์ จากการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติ ทางชีวเคมี พบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมแกรมติดสีม่วง มีรูปร่างท่อนสั้น มีการจัดเรียงตัวกระจัดกระจาย มีการสร้างเอนโดสปอร์และการบ่งบอกสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ พบว่า ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100% และ 99% ตามลำดับ จากการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ในห้องปฏิบัติการบนผลลำไยหลังจากการปลูกเชื้อ 9 วัน พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และ S067 ที่ 10^8 cfu/ml มีการเกิดโรคที่ 45 เปอร์เซ็นต์ และ 32.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบในระดับแปลงปลูก พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 และ S067 มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรค 40.63 เปอร์เซ็นต์ 45.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Title: APPLICATION OF ANTAGONISTIC BACTERIA FOR FRUIT ROT DISEASE CONTROL *PESTALOTIOPSIS* SP. AND *LASIODIPLODIA* SP. OF LONGAN PRODUCTION (*DIMOCARPUS LONGAN* LOUR.)

Author: Jirapinya Liamkraituan, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2020

Advisor: Associate Professor Dr. Supuk Mahadtanapuk Co-advisor Assistant Professor Dr.Supaporn Passorn

Keyword Antagonistic bacteria, Fruit Rot Disease, Longan

ABSTRACT

This research was screening of antagonistic bacteria against *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp., the pathogenic fungus fruit rot disease of longan. Total of 120 isolates of bacteria from leaves and soil in longan garden were isolated by spread plate technique. Then, all isolates were tested with mycelia of *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp. on PDA medium by using Dual culture methods. The result showed that, Isolate S050 was presented to inhibition of *Pestalotiopsis* sp. at 72.67 percent and isolate S067 was presented to inhibition of *Lasiodiplodia* sp. at 70.37 percent. For their identification by morphological and biochemical test were used, coupled with molecular techniques. The results indicate that the morphological character of the isolates was related gram-positive bacteria, rod-shaped, endospore-forming bacteria. For molecular biology method result shown that, the isolates S050 and S067 were similarity to *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* with 100% and 99% identity. The antagonistic bacteria with hight antifungal activity to inhibition of *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp. were proved in In vitro condition with 10^8 cfu/ml concentration of antagonistic on longan fruits. After 9 days of incubation with S050 and S067 significant differences were registered between disease incidence at 45 percent and 32.5 percent, respectively. Moreover, the tested field condition found that isolates antagonist bacteria S050 and S067 percentage of disease at 40.63 percent and 45.63 percent, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ปี 2561 รหัสโครงการ MSD61I0002 สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาวิจัย วิสาหกิจชุมชนบ้านต๋ำใน จังหวัดพะเยา อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค ที่ช่วยเหลือในด้านวิชาการ ความรู้ และแนวปฏิบัติต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย และเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์และตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้การอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
สารบัญตาราง .... ญ
สารบัญภาพ .... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
สมมติฐานของการวิจัย 3
ขอบเขตของการวิจัย 3
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
ลำไย 4
แหล่งปลูกลำไย 4
ลักษณะพฤกษศาสตร์และพันธุ์ลำไย (กรมวิชาการเกษตร, 2558) 5
ลำไยพันธุ์ดอหรืออีดอ 6
สาเหตุของโรคพืช 7
โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559) 8
โรคผลเน่าในลำไย 9
การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biocontrol) 12

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 12
การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช 13
ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคพืช 14
เชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ควบคุมโรคพืช 15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 21
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องแก้ว 21
ขั้นตอนและวิธีการวิจัย 24
บทที่ 4 ผลการทดลอง 31
การศึกษาเชื้อสาเหตุโรค และการแยกเชื้อราสาเหตุโรคในลำไย 31
การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย 35
การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกมาจากบริเวณผิวใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย 38
การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่ฤทธิ์ต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคบนผลลำไย ในห้องปฏิบัติการ 53
การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคบนต้นลำไย ในแปลงปลูกพื้นที่ วิสาหกิจชุมชนบ้านต๊ำ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 60
การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ และ การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย 65
บทที่ 5 บทสรุป 67
สรุปผลการทดลอง 67
อภิปรายผลการทดลอง 68
ข้อเสนอแนะ 74
บรรณานุกรม 76
ภาคผนวก 81
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 82

ภาคผนวก ข การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย 86

ภาคผนวก ค สูตรคำนวณ 90

ประวัติผู้วิจัย 91

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ลักษณะทางกายภาพที่พบของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบ และดิน 37

ตาราง 2 สรุปค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture ของแบคทีเรียทั้งหมด 120 ไอโซเลท 39

ตาราง 3 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Pestalotiopsis sp. โดย ใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture..40

ตาราง 4 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Lasiodiplodia sp.โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture..42

ตาราง 5 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์..............47

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา Pestalotiopsis sp.......................................57

ตาราง 7 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา Lasiodiaplodia sp. 58

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา Pestalotiopsis sp. ในแปลงปลูกลำไย..62

ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา Lasiodiplodia sp. ในแปลงปลูกลำไย 63

ตาราง 10 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังจากการฉีดพ่น (CFU/ml) เป็นเวลา 4 สัปดาห์...65

ตาราง 11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน และใบบริเวณสวนลำไย 86

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ช่วงเวลาออกดอก เก็บเกี่ยวผลและคุณสมบัติพิเศษของลำไยบางพันธุ์ 7

ภาพ 2 ลักษณะโคโลนี และลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา Lasiodiplodia theobromae................. 11

ภาพ 3 ลักษณะโคโลนี และลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา Pestalotiopsis sp.............................. 11

ภาพ 4 วิธีการทดสอบแบบ Dual Culture 27

ภาพ 5 บริเวณพื้นที่สวนลำไยที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่าง (A) และ แบบการสำรวจพืชในแปลงปลูกลำไย (B)... 31

ภาพ 6 ลักษณะอาการผลเน่าของลำไยในแปลงปลูก... 32

ภาพ 7 ลักษณะของเชื้อราที่เจริญจากการแยกเชื้อราจากผลลำไยที่มีอาการโรคเน่า............. 32

ภาพ 8 ลักษณะของผลลำไยที่เกิดอาการของโรคกับชุดควบคุม.. 33

ภาพ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA 34

ภาพ 10 ลักษณะของเส้นใย และสปอร์เชื้อรา ที่กำลังขยาย 40X.. 34

ภาพ 11 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากใบลำไยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8}) 35

ภาพ 12 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากดินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8}) 36

ภาพ 13 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา Pestalotiopsis sp. ด้วยวิธี Dual culture 41

ภาพ 14 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา Lasiodiplodia sp. ด้วยวิธี Dual culture 43

ภาพ 15 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ที่อายุ 24 ชั่วโมง เซลล์ติดสีแกรมบวก 44

ภาพ 16 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียจากการย้อมเอนโดสปอร์ ที่อายุ 48 ชั่วโมง โดยที่ลูกศรสีแดงชี้ในส่วนของเอนโดสปอร์.. 45

ภาพ 17 genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 48

ภาพ 18 PCR product ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 โดยใช้ primer 8F และ 1522R พบขนาด PCR product ขนาด 1,500 bp 49

ภาพ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050...49

ภาพ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท S067 50

ภาพ 21 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอ็นเอแบคทีเรียไอโซเลท S050 ในรูปแบบของ Phylogenetic Tree โดยใช้โปรแกรม MEGA Version 10.0.. 51

ภาพ 22 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอ็นเอแบคทีเรียไอโซเลท S067 ในรูปแบบของ Phylogenetic Tree โดยใช้โปรแกรม MEGA Version 10.0..52

ภาพ 23 การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Pestalotiopsis sp. สาเหตุโรคบนผลลำไยภายในห้องปฏิบัติการ 54

ภาพ 24 การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Lasiodiaplodia sp. สาเหตุโรคบนผลลำไยภายในห้องปฏิบัติการ 55

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลำไยเป็นไม้ผลที่สร้างรายได้ไม่ต่ำกว่าปีละ 6,000 ล้านบาท สามารถส่งออกตลาดต่างประเทศได้ทั้งในรูปผลสด อบแห้ง แช่แข็ง และลำไยกระป๋อง ไทยเป็นผู้ส่งออกลำไยรายใหญ่ของโลก โดยส่วนใหญ่ส่งออกในรูปลำไยสด และลำไยอบแห้ง ตลาดหลักลำไยสดของไทยได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนีเซีย และฮ่องกง ส่วนตลาดหลักลำไยอบแห้งของไทยได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน และฮ่องกง ซึ่งในปี 2561 ที่ผ่านมามีปริมาณการส่งออกลำไยสดลดลง ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรตั้งแต่ปี 2560 ถึง 2561 มีปริมาณการส่งออกที่ลดลงจากปริมาณ 727,163.919 ตัน มูลค่า 20,998 ล้านบาท ในปี 2560 เหลือปริมาณ 551,454.215 ตัน มูลค่า 17,219 ล้านบาท ในปี 2561 ซึ่งปริมาณลดลงคิดเป็นร้อยละ 24.61 และร้อยละ 18 ตามลำดับ และผลผลิตรวมคาดว่าจะลดลง เนื่องจากสภาพอากาศร้อนจัด ฝนแล้ง ปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตทำให้การติดผลไม่ดีเท่าที่ควร จำนวนผลต่อช่อลดลง ประกอบกับในบางพื้นที่มีพายุฤดูร้อน และวาตภัย ทำให้ผลอ่อนร่วงหล่นเสียหาย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและทรัพยากร, 2562) ในปี 2562-2563 มีการส่งออกลำไยสดเพิ่มขึ้น เนื่องจากความต้องการบริโภคลำไยจากต่างประเทศเพิ่มขึ้น สามารถส่งออกตลาดต่างประเทศได้ โดยส่วนใหญ่ส่งออกในรูปลำไยสด และลำไยอบแห้ง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและทรัพยากร, 2563)

จากการรายงานของ จริยา วิสิทธิ์พานิช และคณะ พบโรคเน่า ผลลาย ผลแตก และผลร่วง แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญของจังหวัดเชียงใหม่ ที่อำเภอสันทราย หางดง สันป่าตอง จอมทอง และฮอด ในจังหวัดลำพูน พบที่อำเภอเมือง แม่ทา และลี้ และพบโรคนี้ในระดับที่รุนแรงเช่นกัน บริเวณเพาะปลูกดังกล่าว บางสวนโรคทำความเสียหายมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (จริยา วิสิทธิ์พานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง, 2545) ส่วนในจังหวัดพะเยาซึ่งมีพื้นที่ผลิตลำไยสำหรับส่งออกมีรายงานในปี พ.ศ.2545 พบว่าเกิดการระบาดของโรคผลลายที่อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา อย่างรุนแรงเช่นกัน ทำให้เจ้าของสวนลำไยสูญเสียรายได้ และประสบปัญหาการขาดทุนจากการเพาะปลูกลำไย อาการผลลาย

จะเริ่มจากเป็นจุดสีดำขนาดเล็กบนเปลือกผลของลำไย ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นจนลุกลามติดกันทั่วทั้งผล เมื่อแกะเปลือกออกมา พบว่าเกิดแผลสีน้ำตาลกับเปลือกด้านในบริเวณตรงข้ามกับแผลด้านนอกแต่เนื้อผลของลำไยมีอาการผิดปกติ เมื่อผลของลำไยเจริญเติบโตและขยายขนาดขึ้น เนื้อเยื่อตรงบริเวณที่เกิดโรคลำไยปริแตกจะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เข้าทำลายทำให้ผลเน่า ร่วงหล่น และเกิดความเสียหายในที่สุด (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

ปัจจุบันโรคในลำไยเกิดขึ้นมากมาย และมีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญของจังหวัดภาคเหนือเช่น จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และพะเยา เป็นต้น ซึ่งบริเวณเพาะปลูกดังกล่าว โรคเหล่านี้ทำให้เกิดความเสียหายมาก ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องหาวิธีการจัดการโรคลำไย เพื่อแก้ไขปัญหาโรคลำไยที่จะมาสร้างความเสียหายให้กับสวนลำไย ในการแก้ปัญหาของเกษตรกรมักใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicides) ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วได้ผลดี แต่มักจะได้ผลในระยะแรก เนื่องจากเชื้อสามารถปรับตัวเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว (บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ, 2556) จากข้อมูลการใช้สารเคมีมีพิษเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อราของเกษตรกรในประเทศไทย มีมูลค่าเพิ่มขึ้นทุกปีโดยมีรายงานการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตรจากต่างประเทศ พบว่ามีการนำเข้าสารเคมีกลุ่ม สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) ซึ่งการใช้สารเคมีทางการเกษตรเกษตรกรมักใช้เกินความจำเป็น ส่งผลกระทบถึงสภาพแวดล้อมทางการเกษตร ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ และสิ่งมีชีวิต ทั้งยังทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2556) การนำเอาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมเชื้อราก่อโรค จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถควบคุมได้ ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสามารถนำมาใช้ในการป้องกันเชื้อราได้ (บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ, 2556)

ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการควบคุมโรคเน่าในผลลำไยโดยสาเหตุสำคัญจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ทั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าวในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการควบคุมโรคบนต้นพืชต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ เพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าสาเหตุโรคจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยชีววิธีในการผลิตลำไย
2. ทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมโรคผลเน่าสาเหตุโรคจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. บนลำไยในห้องปฏิบัติการ
3. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคบนต้นลำไย และแนวทางการประยุกต์ใช้เชื้อในการควบคุมโรค

สมมติฐานของการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่าในลำไยได้ ซึ่งมีเชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ และแปลงปลูก

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าในลำไย โดยการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบพืช และดิน ในแหล่งปลูกลำไยของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา โดยทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการ แล้วนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปทดสอบการควบคุมโรคในระดับแปลงปลูกช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2562 ในพื้นที่กลุ่มวิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา จากนั้นนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไประบุสายพันธุ์ของเชื้อในระดับดีเอ็นเอ เพื่อประโยชน์ในการเป็นความรู้พื้นฐานที่จะประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับยีนต่อไป

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

คัดเลือกได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถนำไปควบคุมโรคผลเน่าของลำไยในสภาพแปลงปลูก ในพื้นที่ของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยาได้ หรือพื้นที่อื่นที่ประสบปัญหาการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรม อันเป็นประโยชน์ยิ่งในการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรในท้องถิ่น และเป็นการรักษาสุขภาพของเกษตรกร และสิ่งแวดล้อมที่ดีจากการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคลำไยทดแทนการใช้สารเคมี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลำไย

ลำไยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ทำรายได้เป็นอย่างดีแก่เกษตรกรในภาคเหนือของประเทศไทย และถูกบรรจุเป็นหนึ่งในพืชที่ทำรายได้เข้าประเทศได้สูง (product champion) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปี พ.ศ.2540 สามารถทำรายได้เข้าประเทศได้มากกว่าห้าพันล้านบาท โดยมีการส่งออกในรูปของลำไยสด ลำไยอบแห้ง และลำไยกระป๋อง ซึ่งตลาดส่งออกลำไยสดที่สำคัญ ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ แคนาดา และตลาดลำไยแปรรูป ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ และสหรัฐอเมริกา โดยมีการส่งออกในรูปลำไยสด มูลค่าส่งออก 17,219 ล้านบาท ลำไยอบแห้ง มูลค่า 4,700 ล้านบาท ในปี พ.ศ.2561 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและทรัพยากร, 2562) ลำไยเป็นไม้ผลสูงประมาณ 10– 20 ฟุต มีลักษณะคล้ายต้นลิ้นจี่ แต่ใบเล็กกว่า ผลสุกและเก็บได้ภายใน 7 เดือน ผลมีสีเขียวอมเหลือง ผิวเรียบ แต่ค่อย ๆ มีสะเก็ดขึ้นทีละน้อยเมื่อสุก ติดผลประมาณ 20–30 ผลต่อช่อ ผลมีรูปร่างกลมขนาดเท่าลูกหิน เนื้อสีขาว และมีรสหวานเหมือนน้ำผึ้ง สำหรับประเทศไทยนั้นสันนิษฐานว่าลำไยได้แพร่กระจายพันธุ์มาจากประเทศจีนตอนใต้ โดยตามป่าในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย มีลำไยพื้นเมืองขึ้นอยู่ทั่วไปในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียง เช่น ลำพูน เชียงราย พะยา และลำปาง (กรมวิชาการเกษตร, 2558)

แหล่งปลูกลำไย

แหล่งปลูกลำไยที่สำคัญคือจังหวัดภาคเหนือตอนบน ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย คิดเป็นร้อยละ 33.4, 32.6 และ 10.6 ของพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ ตามลำดับ นอกจากนั้นก็ยังมีปลูกในจังหวัดอื่น ๆ เช่น พะเยา ลำปาง น่าน ตาก กำแพงเพชร เลย และจันทบุรี เป็นต้น สำหรับในจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูนนั้น บริเวณที่ปลูกลำไยที่หนาแน่น ได้แก่ บริเวณติดกับแม่น้ำปิง แม่น้ำกวง แม่น้ำทา และแม่น้ำลี้

ลักษณะพฤกษศาสตร์และพันธุ์ลำไย (กรมวิชาการเกษตร, 2558)

ลำไยเป็นไม้ผลเขตร้อน และกึ่งร้อนที่มีลักษณะบางอย่างคล้ายลิ้นจี่ และเงาะ อยู่ในวงศ์ (order) Sapindaceae สกุล (family) Sapindaceae หรือ Soapberry ซึ่งมีพืชที่อยู่ในวงศ์นี้ถึง 130 สกุล (genus) ประมาณ 1,100 ชนิด (species) เดิมลำไยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Euphoria longana* Lamk. และต่อมาได้เปลี่ยนเป็น *Dimocarpus longan* Lour.

ลำต้น ลำไยเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่มแผ่กว้าง มีตั้งแต่ขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ ต้นที่ปลูกจากเมล็ดมีลำต้นสูงตรง เมื่อปลูกจากกิ่งตอนมีทรงพุ่มแผ่กว้าง เมื่อเจริญเติบโตเต็มสูง 10–12 เมตร เปลือกลำต้นสีน้ำตาล หรือสีเทาปนน้ำตาล แตกเป็นสะเก็ด และร่องขรุขระกิ่งกลม และเนื้อไม้มักเปราะทำให้กิ่งหักง่าย

ใบลำไยเป็นใบรวม ที่มีใบย่อยอยู่บนก้านใบร่วมกัน (pinnately compound leaves) จำนวน 3–5 คู่ ก้านใบรวมยาวประมาณ 20–30 เซนติเมตร ใบย่อยจัดเรียงตัวในลักษณะตรงข้ามหรือแบบสลับกัน ก้านใบย่อยยาว 4–6 เซนติเมตร ใบย่อยเป็นรูปรีหรือรูปหอก ใบกว้าง 3–6 เซนติเมตร และยาว 10–15 เซนติเมตร ขอบใบเรียบไม่มีหยัก และไม่ม้วน ใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ปลายใบมักแหลม และฐานใบค่อนข้างป้านด้านหลังใบมีสีเขียวเข้มเป็นมันช่อดอกลำไยออกดอกที่ปลายยอดที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว โดยเปลี่ยนจากตาใบเป็นตาดอก แต่บางครั้งช่อดอกก็อำจเกิดจากตาด้านข้างของกิ่งก็ได้ ตั้งแต่เริ่มเห็นช่อดอกด้วยตาเปล่าจนก้านช่อดอกพัฒนาจนยาวเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 45–50 วัน ขึ้นกับพันธุ์ และสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิ โดยช่วงที่มีอากาศหนาวเย็นช่อดอกจะพัฒนาช้ากว่าช่วงที่มีอุณหภูมิอุ่นหรือสูงขึ้น ช่อดอกของลำไยเป็นแบบ compound dichasia ที่จัดเรียงดอกแบบ panicle กล่าวคือแตกก้านดอกแขนงออกไปจากก้านที่หนึ่ง และแต่ละก้านย่อยนั้นแตกแขนงต่ออีกครั้ง ช่อดอกยาว 15 –50 เซนติเมตร ในแต่ละช่อดอกมีทั้งดอกสมบูรณ์เพศ และดอกไม่สมบูรณ์เพศ แต่ละช่อดอกมีดอกประมาณ 3,000 ดอกขึ้นกับพันธุ์ และสภาพแวดล้อม

ดอก ดอกมีสีครีม และเส้นผ่าศูนย์กลาง 6–8 มิลลิเมตร ก้านดอกยาว 1–2 มิลลิเมตร กลีบดอกมี 5 กลีบ บางเรียวเล็ก สีขาวหม่น และเรียงตัวเยื้องกัน กลีบรองดอกมี 5 กลีบเช่นกัน สีเขียวปนน้ำตาล หนา และแข็ง ขนาดกว้างกว่ากลีบดอก 3–5 เท่า ที่ฐานของกลีบรองดอกมีต่อมน้ำหวาน โดยทั่วไปช่อดอกมักมีจำนวนดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมีย แต่สัดส่วนของเพศดอกทั้งสองชนิดนี้ผันแปรมากระหว่างช่อดอกในต้นเดียวกันหรือต่างต้นกัน นอกจากนี้สัดส่วนเพศดอกยังแตกต่างกันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิหรือความชื้น การบานของดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียในช่อดอกเดียวกันก็ไม่พร้อมกัน ลำดับการบานของดอกอาจเป็นดอกตัวผู้เริ่มบานก่อน และตามด้วยดอกตัวเมีย หรือดอกตัวเมียเริ่มบานก่อน และดอกตัวผู้

บาน โดยจะมีช่วงเวลาที่ดอกทั้งสองชนิดนี้บานเลื่อมกันอยู่ สำหรับปัจจัยที่ควบคุมรูปแบบการบานของดอกลำไยแต่ละชนิดนั้นยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน

ผล ลำไยเป็นผลเดี่ยวจากเริ่มติดผลจนเก็บเกี่ยวผลใช้เวลาพัฒนาประมาณ 4–6 เดือน ขึ้นกับพันธุ์ และสภาพแวดล้อม เช่น หากมีอุณหภูมิต่ำจะทำให้อัตราการพัฒนาของผลต่ำ เป็นต้นผลลำไยที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลมแป้น ขนาดของผลแตกต่างกัน เปลือกผลเจริญมาจากผนังรังไข่ และเริ่มพัฒนาไปพร้อม ๆ กับเมล็ด ต่อมาเมล็ดหยุดการพัฒนาแต่เปลือกผลยังมีการพัฒนาต่อจนเก็บเกี่ยวผลได้ เปลือกผลสีเหลืองปนน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง แต่บางพันธุ์ เช่น เบี้ยวเขียว อาจมีสีเขียวปน เปลือกผลอาจเป็นตุ่มหรือค่อนข้างเรียบ เนื้อของลำไย (aril) พัฒนามาจากเนื้อเยื่อรอบ ๆ ก้านของเมล็ด (funiculus) ขึ้นมาโอบจนรอบเมล็ด เนื้อลำไยสีขาวขุ่นหรือสีชมพูเรื่อ ๆ แตกต่างกันตามพันธุ์

เมล็ด ลักษณะกลมหรือกลมแบน เปลือกเมล็ดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ เป็นมันส่วนที่ติดกับขั้วเมล็ด มีวงกลมสีขาว ทำให้ดูคล้ายกับลูกนัยน์ตา และเป็นที่มาของคำว่า ตามังกร ขนาดเมล็ดต่างกันตามพันธุ์

ลำไยพันธุ์ดอหรืออีดอ

ดอหรืออีดอ เป็นพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี ทนแล้ง และทนน้ำได้ดีปานนกลาง ทรงพุ่มกว้างพอสมควร ลำต้นแข็งแรง กิ่งไม่ฉีกหักง่าย เปลือกลำต้นสีน้ำตาลปนแดง เป็นลำไยพันธุ์เบาที่ออกดอก และเก็บเกี่ยวได้ก่อนพันธุ์อื่น กล่าวคือ ออกดอกธันวาคม และเก็บเกี่ยวได้ปลายมิถุนายนหรือกรกฎาคม (ภาพ 1) เนื่องจากเก็บเกี่ยวเร็ว และจำหน่ายได้ทั้งผลสด และแปรรูปเป็นลำไยกระป๋อง และลำไยอบแห้ง ทำให้จำหน่ายได้ราคาดี และชาวสวนนิยมปลูกมากที่สุด ใบย่อยมี 3–4 คู่ใบ ใบแก่สีเขียวเข็ม ปลายใบค่อนข้างแหลม ขนาดผลกว้างประมาณ 2.7 เซนติเมตร เนื้อสีวุ้น และค่อนข้างเหนียว รสหวานปานนกลาง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 20 บริกซ์ เมล็ดค่อนข้างใหญ่ และแบนเล็กน้อย ผลผลิตเฉลี่ยของเกษตรกร 793 กิโลกรัม/ไร่ (16 ต้น/ไร่) ลำไยพันธุ์ดอสามารถแบ่งตามสีของยอดอ่อนได้ 2 ชนิด คือ

1. ดอยอดแดง เจริญเติบโตเร็ว ใบอ่อนมีสีแดง ใบย่อยกว้าง 6 เซนติเมตร และยาว 20เซนติเมตร ขอบใบเป็นคลื่น และห่อลงเล็กน้อย ออกดอกติดผลไม่ค่อยดี ผลกลม เปลือกผลสีน้ำตาลแก่

2. ดอยอดเขียว ใบอ่อนเป็นสีเขียวอ่อน ขนาดใบเล็กกว่าดอยอดแดงเล็กน้อย ขอบใบเป็นคลื่น เล็กน้อย ออกดอกติดผลค่อนข้างง่าย ผลขนาดปานกลาง ลักษณะเบี้ยว และยกบ่าข้างเดียว เปลือกผลมีสีเขียวปนน้ำตาล สามารถแบ่งตามลักษณะของก้านผลได้ 2 ชนิด คือ ดอก้านอ่อนซึ่งมีเปลือกผลบาง และดอก้านแข็งซึ่งเปลือกผลหนา

พันธุ์	การออกดอก	การเก็บเกี่ยวผล	คุณสมบัติพิเศษ
ดอ	ปลายธ.ค.-ม.ค.	ปลายมิ.ย.-ก.ค.	เก็บผลได้ก่อนพันธุ์อื่น
สีชมพู	ปลายธ.ค.-ม.ค.	ปลายก.ค.-ส.ค.	เนื้อมีสีชมพูเรื่อๆ รสชาติดี
เบี้ยวเขียว	ปลายม.ค.-ต้น ก.พ.	กลางส.ค.-ต้นก.ย.	เก็บหลังพันธุ์อื่น เปลือกสีเขียว รสชาติดีมาก
แห้ว	ปลายม.ค.-ต้น ก.พ.	กลางส.ค.-ต้นก.ย.	เนื้อแน่น กรอบ รสชาติดี
ใบดำ	ปลายธ.ค.-กลางม.ค.	ปลายส.ค.-ต้นก.ย.	ทนแล้งและทนน้ำ ออกดอกสม่ำเสมอทุกปี
อีแดงกลม	กลางม.ค.-ปลายม.ค.	ต้นส.ค.-ปลายส.ค.	เก็บไว้บนต้นได้นานกว่าพันธุ์อื่น
เพชรสาคร	ธ.ค.-ม.ค.(ในฤดู)	ปลายก.ค.-ส.ค.	ออกดอกทวายและมากกว่าหนึ่งครั้งต่อปี
	ก.ค.-ส.ค.(นอกฤดู)	ปลายธ.ค.-ม.ค.	

ภาพ 1 ช่วงเวลาออกดอก เก็บเกี่ยวผลและคุณสมบัติพิเศษของลำไยบางพันธุ์

ที่มา: (กรมวิชาการเกษตร, 2558)

สาเหตุของโรคพืช

สาเหตุของอาการโรคพืชนั้นอาจเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงเช่น การเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค สาเหตุทางอ้อมอาจเกิดจากปัจจัยสภาพแวดล้อม ได้แก่ การขาดแร่ธาตุอาหาร การได้รับพิษจากสารเคมีมากเกินไป ความเสียหายเนื่องจากพืชได้รับอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ความแห้งแล้ง ไฟป่า เป็นต้น อาการผิดปกติเนื่องจากสาเหตุเหล่านี้ บางครั้งพืชแสดงอาการคล้ายกันกับโรคติดเชื้อ เช่น อาการขาดแร่ธาตุบางชนิด แสดงอาการซีดเหลืองคล้ายกับที่เกิดจากเชื้อไวรัส และมายโคพลาสมาและอาการเป็นพิษจากสารเคมีที่ทำให้เกิดแผลคล้ายที่เกิดจากเชื้อรา เป็นต้น (ไพโรจน์ จ๋วงพานิช, 2559) ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีที่เป็นพิษมากขึ้นเรื่อย ๆ จากข้อมูลการใช้สารเคมีมีพิษเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อราของเกษตรกรในประเทศไทย มีมูลค่าเพิ่มขึ้นทุกปีโดยมีรายงานการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตรจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ.2551–2555 พบว่ามีการนำเข้าสารเคมีกลุ่มสารป้องกัน และกำจัดโรคพืช (Fungicide) คิดเป็นมูลค่า 3,883 ล้านบาท

ซึ่งการใช้สารเคมีทางการเกษตรในปริมาณมากนี้ ส่วนใหญ่เกษตรกรมักใช้เกินความจำเป็น ส่งผลกระทบถึงสภาพแวดล้อมทางการเกษตร ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ และสิ่งมีชีวิต ทั้งยังทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2556)

โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)

เป็นเชื้อที่พบว่า ทำให้เกิดโรคแก่พืชมากที่สุด และทำให้เกิดอาการประเภทต่าง ๆ บนพืชมากที่สุดด้วย เช่น ใบเป็นแผลจุด ใบไหม้ใบติด ใบเหี่ยว รากเน่า โคนเน่า ผลเน่า เมล็ดเน่า ต้นกล้าเน่า หรือแห้งตายทั้งต้น เชื้อราส่วนใหญ่ มีการแพร่ระบาดโรคด้วยส่วนที่เรียกว่า สปอร์ (spore) โดยมีน้ำ ลม หรือสิ่งมีชีวิตเป็นตัวนำ หรืออาจติดไปกับส่วน ของพืช และดินที่เป็นโรค เชื้อราบางชนิดพักตัวอยู่ในส่วนของพืช และดินเป็นเวลานานนับปีมีความสามารถในการเข้าทำลายพืชได้ทั้งทางบาดแผล ช่องเปิดธรรมชาติหรือเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยตรง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา อาการใบไหม้เป็นวงซ้อนของใบกล้วยไม้ซึ่งเกิดจากเชื้อราเข้าทำลายบริเวณที่ถูกแดดเผา เชื้อราแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 4 กลุ่มด้วยกันคือ

1. ไฟโคไมซิทิส (phycomycets) เรามักเรียกเชื้อราในกลุ่มนี้ว่า ราชั้นต่ำ หรือราน้ำ มีลักษณะที่สำคัญคือ เส้นเชื้อราไม่มีผนังเซลล์กั้นด้านขวาง เรียกว่า โคโนไซติกไฮฟีหรืออะเซพเทตไฮฟี (coenocytic hyphae หรือ aseptate hyphae) ขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างโซโอสปอร์หรือสปอร์ ที่มีหางในถุงหุ้มโซโอสปอร์ (zoosporangium) และแบบอาศัยเพศโดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะ และเพศต่างกัน ให้สปอร์ผนังหนาผิวเรียบ เรียกว่า โอโอสปอร์ (oospore) หรืออาจเกิดจากการผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะ และเพศต่างกันแต่ต่างเพศกันให้สปอร์ผนังหนาขรุขระ เรียกว่า ไซโกสปอร์ (zygospore) สปอร์เหล่านี้จะแพร่ระบาดโดยลมพัดพาไป หรือว่ายน้ำไป เชื้อราในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคที่สำคัญกับพืชเศรษฐกิจ หลายชนิด

2. แอสโคไมซิทิส (ascomycets) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น (septate hyphae) ขยายพันธุ์ ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างสปอร์เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) และแบบอาศัยเพศโดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะ และเพศต่างกัน จะเกิดแอสโคสปอร์ (ascospore) ในถุงหุ้มสปอร์ (ascus) ถุงหุ้มสปอร์นี้อยู่ในกลุ่มเส้นใยซึ่งประสานตัวกัน มีผนังหนาสีดำ เรียกว่า ฟรุตติงบอดี้ (fruiting) คนโทปากเปิด (perithecium) และรูปถ้วยแชมเปญ (apothecium) ส่วนของฟรุตติงบอดี้นี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเมื่อเกิดบนพืชเป็นโรค โดยจะเห็นเป็นจุดสีดำ ๆ เชื้อราในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคที่สำคัญหลายชนิด

3. เบสิดิโอไมซิทิส (basidiomycetes) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น ขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยสร้าง สปอร์เรียกว่า โคนิเดีย และแบบอาศัยเพศ โดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะและเพศต่างกัน เกิดสปอร์เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งอาจเกิดอยู่ในฟรุตติงบอดี้หรือเกาะติดอยู่บนเส้นใยที่มีรูปร่างคล้ายกระบอง เรียกว่า เบสิเดียม (Basidium) เชื้อราในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคพืชต่าง ๆ ที่สำคัญ

4. ฟังไจอิมเปอร์เฟกไทหรือดิวเทอโรไมซิทิส (fungi imperfecti of deuteromycetes) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกั้น นิยมจัดให้เป็นเชื้อราในกลุ่มชั่วคราว เพราะปกติจะไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ แต่เมื่อใดที่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในกลุ่มนี้ก็จะจัดย้ายเชื้อรานี้เข้าอยู่ในพวกแอสโคไมซิทิสหรือเบสิดิโอไมซิทิส (ตามลักษณะของสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้างสปอร์ที่ เรียกว่า โคนิเดีย เกิดจากก้านสปอร์เรียกว่า โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) หรือบรรจุอยู่ในฟรุตติงบอดีที่มีรูปร่างหลายแบบ คือ ทรงกลมปิด เรียก พิกนิเดีย (pycnidia) รูปจาน เรียก อาเซอร์วูลัส (acervulus) สปอโรโดเชียม(sporodochium) และซินนีมาตา (synnemata) ฟรุตติงบอดีเหล่านี้สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า และนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรคได้บางครั้ง การแพร่ระบาดของราในกลุ่มนั้นมักเกิดขึ้น โดยเชื้อปลิวไปกับลมหรือติดไปกับส่วนของพืช และดินที่มีพืชเป็นโรคเชื้อราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรคพืช และดินที่มีพืชเป็นโรคเชื้อราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคใบจุด ใบไหม้ต่าง ๆ และรากเน่าที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด เช่น ฟิวราเรียม แอลเทอนาเรีย คอลลีโททริเชียม โกลโอสปอเรียม เซอร์โคสปอรา เซอร์วูลาเรีย และสเคลอโรเชียม เป็นต้น

โรคผลเน่าในลำไย

ลำไยมีอาการเปลือกผลแตกเน่าเมื่อใกล้เก็บเกี่ยว และระบาดทำความเสียหาย เชื้อมีการเข้าทำลาย มีกลุ่มเส้นใยของเชื้อราสีขาวบริเวณรอยแตก และลุกลามลงสู่ผลที่อยู่ด้านล่างของช่อ อาการผลแตกจะเกิดกับลำไยใกล้เก็บเกี่ยวโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผลผลิตลำไยที่จะเก็บเกี่ยวระหว่างช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีฝนตกชุก มีความชื้นสูง ผลผลิตลำไยได้รับความเสียหายมากกว่า 60% จากการศึกษาสาเหตุเบื้องต้นของอาการผลเน่าของลำไย มีลักษณะอาการทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังนี้ (ลักษณ์ วงศ์หิริญภิญโญ และคณะ, 2545)

1. อาการเปลือกแตกที่เกิดจากจุดแผลบริเวณเปลือกผลลำไย ลักษณะเป็นจุดแผลบริเวณเปลือกผลลำไยมีสีเทาดำขนาดประมาณ 2-4 มม. ด้านในของเปลือกจะเห็นจุดดวงสีน้ำตาลหรือสีดำขนาดใหญ่กว่าด้านนอกมาก เกษตรกรเรียกลำไยผิวลาย ได้ทำการแยกเชื้อพบเชื้อราที่น่าจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการดังกล่าว 3 ชนิดคือ *Brotryodiplodia* sp., *Phomophsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp.

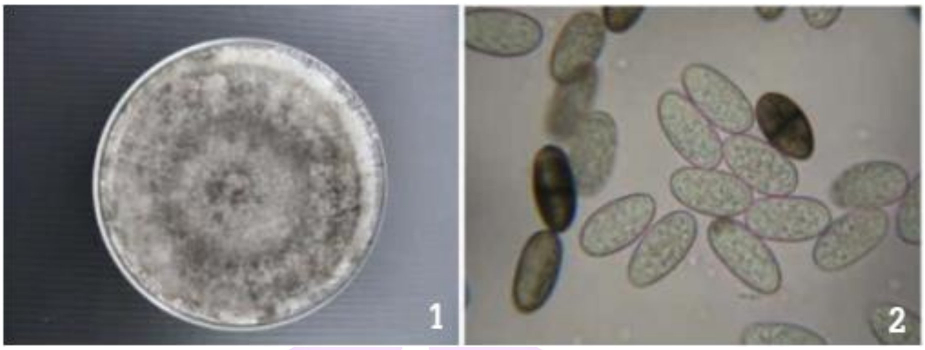
2. อาการแตกที่เกิดจากจุดแผล ซึ่งอาจเกิดจากการทำลายของแมลงบางชนิด เช่น มวนลำไย หนอนเจาะขั้ว แมลงวันทอง เป็นต้น ทำให้เกิดแผลที่เปลือกผลลำไย และทำให้เซลล์บริเวณนั้นตายแต่เปลือกผลส่วนอื่นยังสามารถขยายขนาดของผลได้ต่อไป อาจเป็นผลให้เปลือกบริเวณจุดแผลแตกออกได้

3. อาการเปลือกผลแตกเป็นทางยาวจากด้านขั้วผลมายังด้านล่าง บริเวณรอยแตกส่วนใหญ่จะเห็นรอบคราบสีน้ำตาลเข้ม เนื้อผลจะดันบวมออกมาด้านนอกบริเวณรอยแตก ทำให้น้ำหวานไหลออกมาและมีเชื้อราหลายชนิดขึ้นปกคลุมบริเวณรอยแผลและขั้วผล อาการแตกลักษณะนี้ส่วนใหญ่จะเกิดกับลำไยผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยว

ลำไยเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีศักยภาพในการส่งออกปริมาณสูง ปลูกมากในเขตภาคเหนือ ลำไยจะเริ่มออกผลในเดือนพฤษภาคม และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีฝนชุก มีความชื้นค่อนข้างสูง เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และยังก่อให้เกิดโรคในผลิตผลได้ ซึ่งโรคที่พบมากที่สุด คือ โรคผลเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* และ *Pestalotiopsis* sp. ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตลำไยหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งในระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษา และขณะวางจำหน่ายได้ โดยมีเชื้อราสาเหตุที่สำคัญอยู่ 2 ชนิด ดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2557)

1. เชื้อ *Lasiodiplodia theobromae*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคโลนี (colony) ของเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) มีเส้นใยค่อนข้างฟูสีเทาอ่อนถึงดำ เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body) แบบพิคนิเดีย (pycnidia) ผนังหนา สีดำ แต่ละพิคนิเดียอาจมีช่องเดียวหรือหลายช่องมีปากเปิด (ostiole) โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) เกิดเดี่ยว ๆ รูปทรงกระบอก(oblong) ไม่มีสี (hyaline) ผนังเรียบไม่มีผนังกั้นโคนิเดีย (conidia) มีเซลล์เดียว ใสไม่มีสี เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลดำ มี 2 เซลล์รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลมยาว (ellipoid) ส่วนฐานปลายตัด ลักษณะอาการของโรค เปลือกผลเป็นสีน้ำตาลคล้ำเหมือนเปียกน้ำ จะมีการขยายลามออกไปอย่างรวดเร็ว ถ้ามีความชื้นเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวเทาขึ้นปกคลุมบริเวณแผลที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา ลักษณะภายในผลเนื้อลำไยจะยุบตัว มีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อเละ มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว

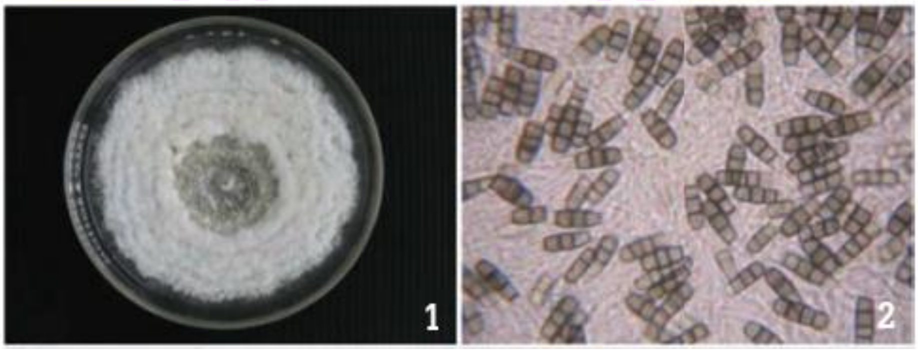


ภาพ 2 ลักษณะโคโลนี และลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ที่มา: (กรมวิชาการเกษตร, 2557)

2. เชื้อ *Pestalotiopsis* sp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโคโลนี (colony) บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เส้นใยมีสีขาวแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร บริเวณกลางโคโลนีจะมีการสร้างของเหลวคล้ายหยดน้ำสีดำ เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body) แบบอะเซอวูลัส (acervulus) โคนิเดีย (conidia) ภายในอะเซอวูลัสโคนิเดียมี 5 เซลล์ เซลล์ส่วนหัว และท้ายมีลักษณะแหลมเรียวใสไม่มีสี (hyaline) เซลล์ตรงส่วนกลางมีสีเข้ม ส่วนท้ายของโคนิเดียมีรยางค์ 2 เส้น หรือมากกว่านั้นลักษณะอาการของโรค เปลือกผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ลักษณะฉ่ำน้ำ มีของเหลวสีน้ำตาลซึมออกมาจากภายในเนื้อผลนิ่ม มีกลิ่นฉุน พบเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญบริเวณผิวเปลือกและขั้วผล ลักษณะภายในผลเปลือกด้านในมีสีน้ำตาล เนื้อลำไยยุบตัว มีสีขาวขุ่นถึงสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว



ภาพ 3 ลักษณะโคโลนี และลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

ที่มา: (กรมวิชาการเกษตร, 2557)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biocontrol)

การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค เพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559) การควบคุมโรคพืชมีอยู่หลายวิธีแต่วิธีที่เกษตรกรชอบใช้คือ การใช้สารเคมีซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อเสียหลายอย่าง คือ สารเคมีที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงยังอาจเป็นอันตรายต่อแมลงและจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้สารเคมียังสามารถสะสมก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในปัจจุบันจึงหันมาใช้การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม การควบคุมโรคพืชได้มีการศึกษาทั้งในประเทศ และต่างประเทศมาเป็นเวลานาน แต่ในปัจจุบันเพิ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรค เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีในขั้นทำเป็นการค้า และมีบทบาทที่สำคัญมากในศตวรรษที่ 21 (จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทน และพราวมาส เจริญรักษ์, 2553) นิยมกระทำกันอยู่ 2 ประเภท คือ การใช้เชื้อที่มีอยู่หรือที่ผลิตขึ้นมาใหม่ เพื่อทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง และการใช้เชื้อพันธุ์ที่อ่อนแอกว่ามาทำลายหรือต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชพันธุ์ปกติ การป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยวิธีชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งเป็นการเลียนแบบธรรมชาติ เนื่องจากปกติในธรรมชาติมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุอยู่แล้ว แต่ในปัจจุบันปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรคในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอาจเนื่องมาจากมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคมากขึ้น ทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคได้ตามธรรมชาติ รวมทั้งการได้ตระหนักถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีที่มีผลต่อผู้ผลิตผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม (K. F. Baker และR. J. Cook, 1974)

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพมีกลไกการควบคุมหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชใน 4 ลักษณะดังนี้ (นิพนธ์ ทวีชัย, 2553)

1. การแข่งขัน (Competition) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีความสามารถในกาเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อโรคพืช เพื่อความอยู่รอดได้ดี ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตจนก่อให้เกิดโรคพืช เช่น มีความสามารถในการหาอาหารได้ดี เจริญเติบโตครอบครองพื้นที่บนผิวพืชได้เร็ว ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญแข่งขันเข้าทำลายพืชได้ ดังนั้น พืชจึงแข็งแรงเจริญเติบโต

โดยไม่มีโรค และให้ผลผลิตสูง เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซูโดโมนาส ฟลูออเรสเซนซ์ (*Pseudomonas fluorescens*) ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสง เมื่อถูกรังสีอัลตราไวโอเลตจะผลิตสารชนิดหนึ่งเรียก ซิเดอโรฟอร์ (siderophore) มาช่วยยึดธาตุเหล็กที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ในการเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช

2. การทำลายชีวิตหรือปฏิชีวนะ (Antibiosis) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทำลายชีวิตเชื้อโรคมีจำนวนมากที่สุด และนับเป็นกลไกชนิดแรกที่ทดลองนำมาใช้ โดยเชื้อปฏิปักษ์จะมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ เพื่อทำลายเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทำให้โรคลดลง ยาปฏิชีวนะมากมายหลายชนิดที่ผลิตขึ้นมาสำหรับใช้รักษาโรคของมนุษย์ สัตว์ และพืช ก็ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้ เช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นต้น

3. การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต คือเชื้อพวกที่สามารถเข้าไปเจริญอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น และคอยดูดกินอาหาร ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกดูดกินอาหารอ่อนแอและตายไป เชื้อโรคพืชหลายชนิดทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไส้เดือนฝอย ที่เป็นศัตรูพืชจะมีเชื้อปรสิตเข้าไปทำลาย ทำให้ลดการเกิดโรคพืชได้ เช่น การใช้เชื้อราไทรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) ทำลายเชื้อโรครากเน่าไฟทอฟทอรา (*Phytophthora* spp.) และการใช้เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส เพเนทรานส์ (*Bacillus penetrans*) ทำลายไส้เดือนฝอยรากปมเมลอยโดกาย (*Meloidogyne* spp.)

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced host resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันได้รับความสนใจศึกษากันมาก เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถชักนำ หรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ โดยเฉพาะการนำเอาเชื้อโรคมาทำให้เกิดสายพันธุ์ ที่หมดความสามารถ ในการทำให้เกิดโรค หรือเป็นเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง แล้วนำไปใส่ในพืช จะกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันหรือต้านทาน การเข้าทำลายของเชื้อโรคเหมือนกับการผลิตวัคซีนสำหรับใช้รักษาโรคของคน และสัตว์ ในประเทศไทยมีการผลิตวัคซีนจากไวรัสพืชสายพันธุ์ไม่รุนแรง เพื่อนำไปสร้างภูมิคุ้มกันโรคไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอ

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช

การนำเชื้อปฏิปักษ์ไปใช้ควบคุมโรคพืชมีหลายวิธีโดยการใช้เชื้อปฏิปักษ์ เพื่อควบคุมโรคที่จะเกิดขึ้นบริเวณผิวราก มีวิธีการใช้เชื้อปฏิปักษ์ที่แตกต่างจากการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคที่จะเกิดขึ้นบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559)

การใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชบริเวณผิวรากมีวิธีการดังนี้

1. การคลุกเมล็ดพืชที่ใช้เพาะปลูกกับเชื้อปฏิปักษ์
2. การราดเชื้อปฏิปักษ์ที่ละลายในน้ำจำนวนมากลงดิน เพื่อให้เชื้อปฏิปักษ์ไปสัมผัสกับรากของพืช
3. การคลุกผสมเชื้อปฏิปักษ์กับดินเพื่อให้เชื้อปฏิปักษ์ลงไปสัมผัสกับรากของพืช
4. การนำรากไปจุ่มในสารละลายเชื้อปฏิปักษ์จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์สัมผัสกับรากของพืชได้อย่างทั่วถึง

การใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดินมีวิธีการดังนี้

1. การทาเชื้อปฏิปักษ์ตรงบริเวณแผลที่ส่วนของลำต้นและกิ่งก้านของพืช
2. การพ่นเชื้อปฏิปักษ์ที่ทำเป็นสารแขวนลอยให้ทั่วต้นพืช ซึ่งมีหลักการปฏิบัติเหมือนการพ่นสารเคมีเพื่อกำจัดโรคพืช

ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคพืช (W. J. Janisiewicz, 1988)

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)
2. การแข่งขัน
3. การเป็นพาราไซด์ (Parasite)
4. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR)
5. การกระตุ้นให้พืชมีภูมิต้านทาน (induced systemic resistance: ISR)
6. การผลิตสารยับยั้งเชื้อโรค เช่น ไซเดอโรฟอร์ (siderophore) เป็นต้น
7. การผลิตสารเสริมประสิทธิภาพยึดติดแนบแน่นกับผิวพืช
8. ส่งเสริมกลไกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ
9. การรักษา และแก้ไขความผิดปกติปรับสภาพความสมดุลให้พืชทางสรีระ และชีวเคมี
10. การแก่งแย่ง ยับยั้ง การใช้สารอาหารจำเป็นของเชื้อโรค เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และสารยับยั้ง เป็นต้น
11. กระตุ้นให้พืชนำธาตุอาหารมาใช้มากขึ้น
12. การสลายเศษซากพืช
13. การเคลื่อนที่จากผิวเมล็ดเข้าท่อน้ำ และสู่ดิน

เชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ควบคุมโรคพืช

ตัวอย่างเชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน มีทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้กัน และผลิตขายในระดับอุตสาหกรรม เช่น (เยาวพา สุวัตถิ, 2553)

1. *Bacillus* spp. คือ แบคทีเรียรูปท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flaggella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกันกับแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. และ *Desulfotomaculum* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่นิยมนำมาควบคุมโรคพืชมีดังต่อไปนี้

1.1 *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสามารถสร้างแคปซูล (capsule) และมีการสร้างแอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีโครงสร้างที่มีความทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี แหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน ซึ่งโดยปกติแล้วเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มักจะพบแหล่งอาศัยอยู่ภายในพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบความเสียหายต่อพืชที่อาศัยอยู่ โดย *Bacillus subtilis* สามารถเข้าทำลายโดยตรง ทั้งยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด และสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน มีความสามารถในการปรับตัว และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยน และวิกฤตโดยการสร้างสปอร์ และทนต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี *Bacillus subtilis* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารพวก Toxic metabolite บางชนิดที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นการเกิดความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เข้าทำลายได้

1.2 *Bacillus thuringiensis* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก สร้าง spore และผลึกโปรตีนหลายรูปแบบ เนื่องจากผลึกโปรตีนที่สร้างขึ้นนี้มีฤทธิ์ในการทำลายแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆ เมื่อตัวอ่อนของแมลงกินผลึกโปรตีนนี้เข้าไป สภาพความเป็นด่างในกระเพาะอาหารส่วนกลางจะย่อยสลายผลึกโปรตีนได้ protoxin และน้ำย่อย protease จะช่วยกระตุ้นให้ protoxin เข้าทำลายเซลล์ผนังกระเพาะอาหารของแมลงให้บวม และแตกออก เชื้อ BT ในกระเพาะอาหารจะไหลเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวของแมลง มีผลกระทบต่อระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้แมลงมีอาการโลหิตเป็นพิษ ชักกระตุก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด ปัจจุบันเชื้อ Bacillus ได้เข้ามามีบทบาทในการควบคุมแมลงศัตรูสำคัญ ทั้งทางด้านการเกษตร และการแพทย์ เช่น การนำมาพัฒนาเป็นสารกำจัดหนอนแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ เช่น หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และควบคุมปริมาณของลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ

2. *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราชั้นสูงที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์ และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเป็น parasite โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อโรคแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase, cellulase, b-1, 3-glucanase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อโรคพืช ทำให้เชื้อโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต ทำให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะเจริญโดยสร้างเส้นใย และspore ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืช ด้านการใช้อาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารที่จำเป็นต่อการเจริญ ของเส้นใยได้เป็นอย่างดีขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาเพื่อยับยั้ง หรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการ lysis ได้ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงได้มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Sclerotium* spp, *Pythium* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดเน่า รากเน่า โดยปัจจุบันได้มีการผลิตเชื้อ *Trichoderma harzianum* เป็นผลิตภัณฑ์

3. *Chaetomium* spp. เป็นเชื้อราพวก saprophytes ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes สามารถเจริญได้ดีในเศษซากพืช และสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง และอินทรียวัตถุต่าง ๆ มีการขยายพันธุ์โดยใช้เพศ และทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี โดยพบว่ามี *Chaetomium globosum* และ *Chaetomium cupreum* สายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจง สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. โดยได้มีการทดลองการควบคุมโรคทั้งในพืชผัก และไม้ผล พบว่า สามารถควบคุมโรคได้เท่าเทียมกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และช่วยให้การเจริญเติบโตของพืช และผลผลิตดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังมีคุณสมบัติป้องกันโรคในลักษณะ broad spectrum mycofungicide ได้ด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศักดิ์มนตรี นาชัยเวียง ได้ทำการศึกษา และสำรวจเชื้อราในลำไยพันธุ์ดอ (*Euphoria longana Lamk cv.* Daw) ช่วงต่าง ๆ โดยการแยกเชื้อราจาก 2,680 ตัวอย่าง ซึ่งได้นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวก่อนแล้วด้วยวิธี Triple Sterilization ตรวจสอบชนิดของเชื้อที่แยกได้ จากนั้นนำมาปลูกที่ขั้วผลเพื่อหาชนิดของเชื้อรา สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยว โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เปลือกลำไย ผลของการแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ 14 ชนิด จากกิ่งยอดในช่วงก่อนการแทงช่อดอก 13 ชนิด จากช่อดอกในช่วงออกดอก 11 ชนิด จากช่อผลในช่วงติดผลอ่อน และ 9 ชนิด จากส่วนต่าง ๆ ของผลในช่วงเก็บเกี่ยว เชื้อที่แยกพบทุกช่วงทั้งก่อน และหลังการ

เก็บเกี่ยวมี 11 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger.*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, และ *Pestalotiopsis* sp. ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถระบุชื่อในกลุ่ม sphaeropsidaceae 1 ชนิด และใน Deuteromycetes 4 ชนิด เชื้อที่พบก่อนการเก็บเกี่ยวเท่านั้นมี 6 ชนิดได้แก่ *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp. และ *Nigrospora* sp. และช่วงหลังเก็บเกี่ยวเท่านั้นมี 1 ชนิด ได้แก่ *Rhizopus* sp. และจากการทดสอบเพื่อหาชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยการนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมาปลูกลงบนขั้วผลของลำไยจำนวน 3 ชุดทดลองคือ ชุดทดลองที่ 1 หลังจากปลูกเชื้อแล้วนำไปเก็บที่ 5 องศาเซลเซียส ทันที ชุดทดลองที่ 2 หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง นำไปเก็บที่ 5 องศาเซลเซียส และชุดทดลองที่ 3 ปลูกเชื้อรา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่าทุกเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lasiodiplodia theobromae* และ *Pestalotiopsis* sp. สามารถทำให้เปลือกของลำไยทั้ง 3 ชุดทดลอง เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเร็วขึ้น และทำให้ลำไยชุดทดลองที่ 1 เน่าภายใน 22 วัน ชุดทดลองที่ 2 เน่าภายใน 18 วัน และชุดทดลองที่ 3 เน่าภายใน 6 วัน ซึ่งเร็วกว่าชุดควบคุมและลำไยที่ปลูกด้วยเชื้อรา ชนิดอื่นประมาณ 4 วัน (ศักดิ์มนตรี นาชัยเวียง, 2537)

ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากพืชวงศ์ลำไยในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย จากการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์จากพืชวงศ์ลำไย (sapindaceae) บนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) สามารถแยกได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Pestalotiopsis sp.* และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี Dual culture เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสองชนิดได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท คือ LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc9, SCH1 และ SCH2 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ที่ 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ และ LEP1, LEP2, LEP3, LITc7, SCH1, SCH2 และ SCH3 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ที่ 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย โดยการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้บนผลลำไย พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าของลำไยได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และจากการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไย พบว่าผลลำไยที่พ่นเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลทมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556)

บุญญวดี จิระวุฒิ, อมรา ชินภูติ และรัตตา สุทธยาคม ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ โดยแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากเมล็ดถั่วลิสง ลำไยอบแห้ง ขั้วหวีของกล้วย และเมล็ดถั่วแดง ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 18 ชม. หลังจากนั้น พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เปรียบเทียบกับพ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) และอิมาซาลิล 500 มก./ล. พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงโรคผลเน่าของเงาะได้ 57.82, 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าอิมาซาลิล 500 มก./ล. จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า เป็นแบคทีเรียรูปท่อนติดสีแกรมบวก สร้างเอ็นโดสปอร์ และสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส จัดอยู่ในกลุ่ม Bacillus จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาจัดจำแนกชนิดด้วยชุดตรวจสอบ API test kit และ เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % ส่วน PN 10 และ DL 9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 และ 99.86% ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *plantarum* เมื่อนำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney) จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ มาพัฒนาชีวภัณฑ์ผง 3 สูตร หลังจากเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรชีวภัณฑ์ที่มีส่วนผสมแป้งข้าวเจ้า 100 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร และซูโครส 10 กรัม มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 สูง เท่ากับ 7.55×10^8, 3.73×10^8 และ8.53×10^7 cfu/g ตามลำดับ และชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่ปลูกเชื้อรา *Lasiodiaplodia theobromae* ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรง (บุญญวดี จิระวุฒิ, อมรา ชินภูติ และรัตตา สุทธยาคม, 2560)

บุญญวดี จิระวุฒิ ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อรา พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtillis* หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่สามารถควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ และผลิตเป็นชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวได้แบคทีเรีย *Bacillus tequilensis* และ *Bacillus subtilis* sub sp. *Inaquosorum* ควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร และพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษที่เป็นปฏิปักษ์

กับเชื้อราที่มีการสร้างสารพิษ และสามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในข้าวโพดได้ (บุญญวดี จิระวุฒิ, 2559)

ปิยะวรรณ ขวัญมงคล ศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอหลังการเก็บเกี่ยว ทำการทดสอบหาความเขมขนของสารเคลือบผิวไคโตซานพอลิเมอรที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยเพาะเชื้อบน potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารละลายไคโตซานใหมีความเขมขน 0.05, 0.25, 0.5 และ1% พบว่า ไคโตซานพอลิเมอรความเขมขน 0.5 และ1% มีความสามารถในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ จึงได้ทำการศึกษาผลของสารเคลือบผิวตอกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส การสร้างสารการยับยั้งเชื้อรา รวมถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและกระบวนการในเก็บรักษาลำไยพันธุ์ดอหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า ไคโตซานพอลิเมอร์ไม่มีผลต่อการกระตุ้นหรือการชักนำในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. บนเปลือกผลลำไยที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเก็บรักษา ไมมีผลตอการเสียน้ำหนัก และคุณภาพด้านประสาทสัมผัส ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว แต่สีของเปลือกคล้ำลง ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานโอลิโกเมอร์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยการผสมสารละลายไคโตซานที่ความเข้มขน 0.05, 0.25, 0.5 และ 1% พบว่าไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่ความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ เมื่อนำไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% ไปฉีดพ่นบนลำไยพันธุ์ดอก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่า สามารถชักนำหรือกระตุ้นใหเปลือกลำไยสร้างสารยับยั้งการเจริญเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้แต่ไม่มีผลตอกิจกรรมของเอนไซมไคติเนสของเปลือกลำไย เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวนำผลลำไยไปเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยไคโตซานโอลิโกเมอร์มีการเกิดโรคน้อย (ปิยะวรรณ ขวัญมงคล, 2551)

ปฏิกรณ์ อินโองการ และศิริลักษณ์ สันพา ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Curvularia lunata* เชื้อราสาเหตุโรคกล้าเน่าของข้าว โดยใช้วิธี Dual culture plate บนอาหาร Potato dextrose agar สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 10 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar well diffusion method พบแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Curvularia lunata* TISTR 3068 มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ คือ *Bacillus* sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคกล้าเน่า โดยทดสอบบนวัสดุเพาะ ใช้เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่สปอร์แขวนลอย *Curvularia lunata* TISTR 3068 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 conidia/ml พบว่าแบคทีเรีย

Bacillus sp. SB6 และ *Bacillus* sp. SB9 ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ให้ผลลดการปกคลุมของเชื้อราได้เมื่อทดสอบการใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า *Bacillus* sp. SB9 ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 cfu/ml ให้ผลความยาวรากความสูงต้น และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าสูงสุดคือ 4.77, 6.88 และ1130.05 เซนติเมตร ตามลำดับ (ปฏิกรณ์ อินโองการ และศิริลักษณ์ สันพา, 2560)

วาสนา เนียมแสวง ทำการคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 48 ไอโซเลท นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วย dual culture technique พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ IKPS4, IKPS27, IKPS36, IKPS42 และ IKPS 46 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้โดยไอโซเลท IKPS4 ยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 56.67±8.819 เปอร์เซ็นต์และเมื่อนำมาจัดจำแนกลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเป็นจีนัส Bacillus สภาวะ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรค พบว่า ค่า pH 7.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุด นำมาปรับระดับความเข้มข้น 5 ระดับ พบว่าที่ 100 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพดีที่สุดเท่ากับ 65.01±15.28 เปอร์เซ็นต์เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เส้นใยมีขนาดเล็ก และสั้นกว่าเส้นใยปกติ จากนั้นนำสารยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบมาควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนเมล็ดถั่วลิสง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100.00 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยราได้ดีที่สุด ในระยะเวลา 3 วัน (วาสนา เนียมแสวง, 2562)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องแก้ว

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องเขย่า (Shaker)

1.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical A lance)

1.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Air Flow)

1.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

1.6 ตู้เย็น (Refrigerator)

1.7 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

1.8 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate)

1.9 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

1.10 เครื่องรันเจล (Electrophoresis tank and Power supply)

1.11 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1.12 เครื่อง Electroporator (BioRad Gene Pulser)

1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

1.14 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)

1.15 ไมโครปิเปต (Micro pipette)

2. เครื่องแก้ว

2.1 แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ (Microscope Slide and Cover Slide)

2.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

2.4 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

2.5 บีกเกอร์ (Glass Beaker)

2.6 หลอดทดลอง (Test Tube)

2.7 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube with Screw Cap)

2.8 แท่งแก้วรูปตัววี (V–Shape Glass Tube)

2.9 แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Glass Spreader Microbiology)

2.10 ขวดเก็บสารละลาย (Media Bottle)

3. อุปกรณ์อื่น ๆ

3.1 อลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium Foil)

3.2 ที่วางหลอดทดลอง (Test Tube Rack)

3.3 ปากคีบ (Forceps)

3.4 ลูกยางสามทาง (Rubber Pipette Filler)

3.5 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.6 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.7 สำลี (Absorbent Cotton Wool)

3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.9 Cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm.

3.10 ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด (Scalpel Handle and Blades Surgical)

3.11 หลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 ml (Micro test tubes)

3.12 หลอดสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Reaction Tube)

3.13 Anaerobes Jar

3.14 Cuvette หนา 10 mm.

3.15 พาราฟิล์ม 4IN×125FT Roll

4. สารเคมีที่ใช้

4.1 Ethanol

4.2 น้ำกลั่น

4.3 10% Sodium Hypochlorite (Chlorox)

4.4 Lacto phenol Cotton Blum

4.5 ชุดย้อมสี ประกอบด้วย สี Crystal violet, Iodine, Acetone–alcohol (Decolorizer) และสี Safranin O

4.6 ชุดสีย้อมสปอร์ ประกอบด้วย สี Malachite green และสี Safranin O

4.7 Immersion oil

4.8 Potato starch

4.9 Peptone

4.10 Yeast Extract

4.11 Agar

4.12 MR-VP Medium

4.13 5% α-naphthol

4.14 Potassium hydroxide (KOH)

4.15 Hydrogen peroxide (H_2O_2)

4.16 สารเคมี/สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ

4.16.1 Gram-positive bacteria genomic DNA purification kit

4.16.2 RNase

4.16.3 Deionized distilled water

4.17 สารเคมี/สารละลายสำหรับการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ

4.17.1 10X PCR Buffer

4.17.2 $MgCl_2$

4.17.3 10mM dNTPs Mix

4.17.4 สารละลาย 16S rDNA primer คือ

8F Primer [5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3'] และ

1522R Primer [5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3']

4.17.5 Tag DNA polymerase

4.17.6 สารละลาย Template DNA

4.17.7 Deionized water (RNase free water)

4.18 สารละลาย/สารเคมีสำหรับการทำ Electrophoresis คือ

4.18.1 สารละลาย PCR product

4.18.2 6X loading dye

4.18.3 Generuler 1 kp plus DNA ladder (invitrogen™)

4.18.4 Agarose gel

4.18.5 1X TBE

4.18.6 สารละลาย SYBR Gold

5. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

5.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB broth)

6. พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ลำไยพันธุ์อีดอก้านอ่อน

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การศึกษาเชื้อสาเหตุโรค และการแยกเชื้อราสาเหตุโรคในลำไย ประยุกต์ใช้วิธีของ (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

1.1. การสำรวจโรคผลลำไยและแมลงศัตรูลำไย ทำการสำรวจโรคและแมลงศัตรูของลำไย ในแหล่งปลูกลำไยของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา เก็บตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการ และแยกเชื้อสาเหตุ ทำการสำรวจช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561

1.2. การศึกษาสาเหตุของโรคลำไย ทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยที่เกิดขึ้นขณะอยู่บนต้นในสภาพสวน จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการระบาดของโรค เพื่อนำมาวินิจฉัยและศึกษาหาเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

1.3. การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่า และการพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค นำตัวอย่างลำไยที่เก็บมากจากสวนที่เกิดการระบาด มาแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีการแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (tissue transplant) โดยตัดชิ้นพืชบริเวณขอบแผล (บริเวณกึ่งกลางของส่วนเนื้อเยื่อที่ปกติ และเป็นโรค) ให้ได้ขนาด 5x5 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วย้าย

ชิ้นพืชแช่ในสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 3–4 นาที จากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่น 1 นาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นพืชวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จานละ 4 ชิ้น บ่มเชื้อ (incubation) ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1–2 วัน ให้เชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นตัวเนื้อเยื่อ จากนั้นสะกิดปลายเส้นใยของแต่ละ colony ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) เมื่อได้เชื้อราที่แยกจากลำไยแล้ว นำเชื้อราต่าง ๆ ไปทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Koch’s postulates) พร้อมกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp. ที่แยกได้แล้ว เพื่อหาเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง โดยปลูกเชื้อ (inoculation) บนผลลำไยแต่ละช่อ ก่อนทำการปลูกเชื้อพ่นด้วย alcohol 70% ลงบนผลลำไย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำเชื้อราแต่ละเชื้อที่เจาะด้วย cock borror มาวางบนผลลำไย จากนั้นใช้กระดาษฟางที่ชุ่มน้ำ ห่อผลลำไยทั้งช่อ แล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อเป็นสภาพเก็บรักษาความชื้น (moist chamber) ติดฉลาก เชื้อรา 1 ชนิดต่อ 1 ช่อ สังเกตลักษณะอาการ ช่อที่เป็นชุดควบคุม (control) วางด้วยชิ้นอาหาร PDA หลังจากนั้น 2 วันมาเปิดถุงพลาสติกดูอาการบนผลลำไย ถ้าพบลักษณะผลเน่าให้นำมาแยกเชื้ออีก เพื่อให้ทราบว่าเชื้อที่ปลูกถ่ายสามารถทำให้เกิดโรค และเป็นเชื้อเดิมจากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และถ่ายเชื้อ (Sub culture) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) และเก็บไว้บนหลอดอาหารเอียง (slant) เพื่อทำการทดลองต่อไป นำเชื้อราที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. จากการคัดแยกที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคกับลำไยมาศึกษาเพื่อระบุกลุ่มเชื้อ โดยนำเชื้อราที่ต้องการมาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เพื่อสังเกตลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะการเจริญ ตลอดจนลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา จากนั้นใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อ เขี่ยเอาเส้นใยของเชื้อราวางบนสไลด์ที่หยด lactophenol ปิดด้วย cover slips แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยแต่ละชนิด ทำการปลูกถ่ายเชื้อกลับกับผลลำไย นำเชื้อที่ก่ออาการโรคพืชรุนแรงไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไยเพื่อนำไปแยกเชื้อปฏิปักษ์ (เรวดี เคลือบคนโท, 2559)

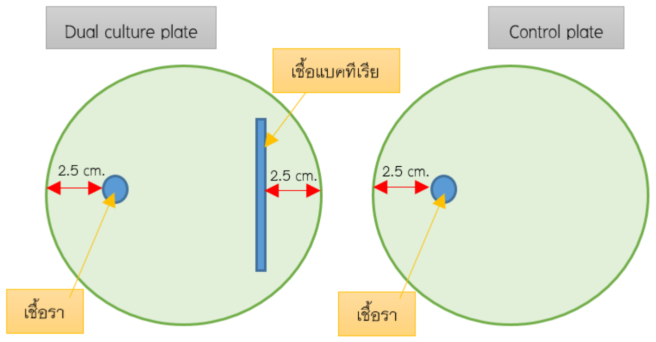
2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ใบลำไย นำใบลำไยที่ไม่เกิดโรคมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1.0×1.0 cm. จากนั้นชั่งใบลำไยปริมาณ 10 g ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask) ที่มีน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 90 ml. เขย่า หรือผสมเพื่อให้ใบลำไยสัมผัสกับน้ำ ทำการเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution method ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8} เท่า ดูดเอาสารละลายมา 100 µl หยดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar (NA) ดังกล่าว มาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวอีกครั้งด้วยวิธี cross streak บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าต่อไป

2.2 การแยกเชื้อจุลินทรียีจากดินบริเวณแปลงปลูกลำไย นำดินบริเวณสวนลำไย โดยการเก็บตัวอย่างดินตั้งแต่ผิวหน้าดินจนลึกประมาณ 5 cm. โดยใช้ท่อกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm. กดลงไปบนดินจนได้ความลึกที่ต้องการ ทำการสุ่มเก็บกระจายทั่วสวนลำไยจำนวน 50 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินที่ได้มาผสมรวมกัน จากนั้นนำมาทำการชั่งดิน 10 g. ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ที่มีน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 100 ml เขย่าหรือผสมเพื่อให้ดินละลายกับน้ำ เจือจางดว้ยวิธี 10-fold dilution method ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8} เท่า ดูดเอาสารละลายมา 100 µl หยดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ด้วยวิธี spread plate จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar (NA) ดังกล่าว มาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวอีกครั้ง ด้วยวิธี cross streak บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าต่อไป

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกมาจากบริเวณผิวใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย

การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกมาจากบริเวณผิวใบ และดินบริเวณบริเวณแปลงปลูกลำไย ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp ใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual Culture (A. M. Skidmore และC. H. Dickinson 1976) ดังภาพที่ 2 โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วเจาะด้วย cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm. นำมาวางบนจากอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหาร 2-2.5 cm. แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นเส้นขนานกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. ด้านตรงข้ามบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา เทียบกับจานอาหารที่ไม่มีการขีดเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (control) และนำค่าที่ได้หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยแทนค่าที่วัดความยาวรัศมีของเส้นใย (A. Gamaliel, J. Katan และE. Conen, 1989)

ดังสูตร ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง [(R1 – R2/R1)] × 100 เมื่อ R1 คือ รัศมีของเชื้อราที่ไม่ได้เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ (control) R2 คือ รัศมีของเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ



ภาพ 4 วิธีการทดสอบแบบ Dual Culture

ที่มา: (K. Sakunyarak และW. Satithorn, 2014)

เมื่อได้เชื้อที่มีคุณสมบัติต้านทานแล้ว (วาสนา เนียมแสวง, 2562) นำไปบ่งบอกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการตรวจสอบลักษณะสัญฐานวิทยา ตรวจคุณสมบัติทางเคมี และจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยวิธีการหาลำดับเบสจากการทำ PCR โดยใช้ primer 8F [5´-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3´] และ 1522R [5´-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3´] (Eduardo N. Esteban และคณะ, 2012) ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S นำชิ้นส่วนที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดังนี้

Intial denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 รอบ 1 นาที

Denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Annealing 69 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
} ตั้งแต่ขั้นตอน Denature จนถึง Extension ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ

Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 รอบ 10 นาที

จากนั้นนำ PCR products ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis แล้วนำไปหาลำดับเบสโดยส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ที่บริษท First BASE Laboratories. ประเทศมาเลเซีย โดยใช้วิธีการ Sanger DNA sequencing จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI เพื่อบ่งบอกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ และเก็บเชื้อไว้ทำการทดลองต่อไป

4. การทดสอบเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุโรคบนผลลำไย

การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคลำไย (จุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์จากการคัดเลือกในข้อ 3) โดยใช้วิธีประยุกต์จาก (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

4.1 เตรียมสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. (เตรียมแยกกัน) ที่แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $1x10^2$, $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^8$ spore/ml (เชื้อราก่อโรคที่แยกได้จากการทดลองข้อ 1.3)

4.2 เตรียมลำไยจากแหล่งปลูกจังหวัดพะเยา นำลำไยใยระยะที่เก็บเกี่ยวมาล้างน้ำสะอาด 2 ครั้ง จนสะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำลำไยไปแช่ในแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของผลลำไย จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดผึ่งให้แห้ง คัดเลือกผลลำไยให้ได้ลักษณะผลที่เหมือนกันอีกครั้ง

4.3 นำผลลำไยที่เตรียมไว้เบื้องต้นมาปลูกถ่ายเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อจุ่มลงในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. ที่แขวนลอยในน้ำแทงผลลำไยลึกประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จำนวน 4 จุด ให้มีระยะห่างรอบผลลำไย แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำผลลำไยที่เตรียมไว้แบ่งออกเป็นชุดนำไปผ่านตามกรรมวิธีการควบคุมโรคโดยวิธีพ่นเชื้อปฏิปักษ์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ $1x10^2$, $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^8$ cfu/ml โดยแต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ผล นำผลลำไยที่ได้ไปวางในถาดพลาสติกที่รองด้วยกระดาษลูกฟูก

ทำการบันทึกผลการทดลองทุก 3 วันหลังจากควบคุมโรคจนกว่าจะหมดอายุการเก็บรักษา หรือผลลำไยถูกเชื้อราทำลายจนเชื้อราสร้างสปอร์เต็มพื้นที่ผิวลำไย โดยจะพิจารณาจากลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด

โรค จากสูตรเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ (จำนวนผลที่เกิดโรค x 100)/จำนวนผลทั้งหมด จากนั้นจะเก็บข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

5. การทดสอบเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุบนต้นลำไย

การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ที่ฤทธิ์ต้านเชื้อราบนต้นลำไย โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556) ซึ่งใช้เชื้อราสาเหตุโรคผสมกับเชื้อปฏิปักษ์ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราและความเข้มข้นของเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด (ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองข้อที่ 4.3) บนช่อผลของลำไยก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ใช้ตัวอย่างไอโซเลทละ 8 ซ้ำ ๆ ละ 1 ช่อ (1 ช่อมีจำนวน 20 ผล) ต่อชุดการทดลอง แล้วทำการทดลองโดยเตรียมตัวอย่างช่อลำไยอายุ 15 ปี ฉีดพ่นฆ่าเชื้อผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 % รอให้แห้งแล้วจึงพ่นสัปดาห์และครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับชุดควบคุมและชุดเปรียบเทียบสารเคมี (สารเคมีชนิดและความเข้มข้นที่เกษตรกรใช้) หลังจากการพ่นสัปดาห์สุดท้ายเวลา 3 วัน จึงเก็บผลลำไยตัดขั้วผล จัดเรียงบนถาดโฟม ถาดละ 1 ช่อ หุ้มด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุก 3 วันเป็นเวลา 15 วัน และนำข้อมูลการเกิดโรคไปทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

6. การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์

การทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556) โดยสุ่มเก็บผลลำไยที่พ่นเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในการทดลองที่ 5 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างกรรมวิธีละ 10 ผล แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำสารแขวนลองของเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมาเจือจางในความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3–7 วัน จึงตรวจนับโคโลนีของเชื้อที่พบ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 1 จานอาหาร

7. การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย

การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556) ใช้วิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยสุ่มเก็บผลลำไยที่พ่นเชื้อปฏิปักษ์จากการทดลองที่ 5 มาแยกเชื้อปฏิปักษ์อีกครั้ง โดยสังเกตและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาที่แยกได้เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองในการทดลองที่ 3

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาเชื้อสาเหตุโรค และการแยกเชื้อราสาเหตุโรคในลำไย

ทำการสำรวจโรคผลเน่าของลำไยช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ 2561 ในแหล่งปลูกลำไยของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา ขนาดแปลงที่ทำการสำรวจมีพื้นที่จำนวน 10 ไร่ ต้นลำไยภายในแปลงปลูกที่ทำการสำรวจมีอายุ 15 ปี มีจำนวนต้น 300 ต้น (ภาพ 5A) โดยจะทำการศึกษาลักษณะอาการของลำไยที่มีผลแตก ผลลาย และอาการเน่าเสีย เปลือกผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ อาการเปลือกแตกบริเวณผลลำไย เกิดจุดสีดำขนาดเล็ก บนเปลือกผลของลำไย (ภาพ 6) ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสำรวจพืชในแปลงปลูกประยุกต์จากวิธีของ กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย โดยการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ (Systematic random sampling) จะกำหนดจุดสำรวจ และรูปแบบการสำรวจแบบกระจายทั่วแปลงจำนวน 10 ต้น สำรวจต้นทรงพุ่ม ต้นละ 4 ทิศ ทิศละ 2 ยอด (ภาพ 5B) และเก็บตัวอย่างลักษณะอาการดังกล่าว ทำการเก็บตัวอย่างของลำไยที่แสดงอาการของโรคผลเน่าในถุงเก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย และพิสูจน์การเกิดโรค

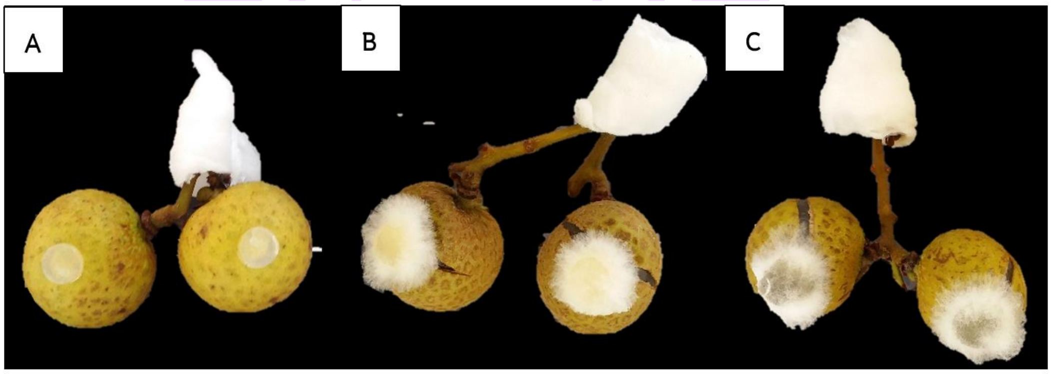
ภาพ 5 บริเวณพื้นที่สวนลำไยที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่าง (A) และ แบบการสำรวจพืชในแปลงปลูกลำไย (B)

ภาพ 6 ลักษณะอาการผลเน่าของลำไยในแปลงปลูก

การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าที่เกิดการระบาดของโรคจากสวน ซึ่งตัวอย่างของลำไยที่เก็บมาจะมีลักษณะของผิวเปลือกลำไยที่แสดงอาการของโรคคือ มีลักษณะของผลแตกผลลาย เปลือกผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ ขั่วผลมีอาการเน่าเสีย เกิดจุดสีดำขนาดเล็กบนเปลือกผลของลำไย และอาการเปลือกแตกบริเวณผลลำไย และทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี Tissue transplanting technique โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่ปรากฏโรคกับเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้วางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 28±2°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อครบเวลาที่กำหนด จะเห็นการเจริญของเส้นใยเชื้อราออกมาจากบริเวณชิ้นเปลือกผลลำไยที่เป็นโรค โดยเชื้อราจะสร้างเส้นใยที่มีสีขาวเจริญออกมาบริเวณที่เป็นแผลของชิ้นเปลือกลำไย (ภาพ 7) จากนั้นนำเชื้อราที่ได้ไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารจานใหม่ (pure culture) และคัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่มีการเจริญ โดยเลือกลักษณะโคโลนีที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp. ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

ภาพ 7 ลักษณะของเชื้อราที่เจริญจากการแยกเชื้อราจากผลลำไยที่มีอาการโรคเน่า

เมื่อได้เชื้อราที่แยกจากลำไยแล้ว นำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulates) พร้อมกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ที่แยกได้แล้ว โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่วางด้วยชิ้นอาหาร PDA เมื่อครบเวลาที่กำหนดมาเปิดดูลักษณะอาการบนผลลำไย พบว่าผลของลำไยที่วางด้วยชิ้นของเชื้อราทดสอบมีลักษณะเปลือกผลแตก ผลเป็นสีน้ำตาลบริเวณขั้วผล เชื้อรามีการเข้าไปทำลายบริเวณผลของลำไย มีลักษณะอาการผลเน่า (ภาพ 8B และ8C) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่วางชิ้นอาหาร PDA พบว่า ไม่มีการแสดงอาการของโรคที่เกิดขึ้น มีลักษณะของขั้วผลคล้ำเล็กน้อย (ภาพ 8A) จากนั้นนำเชื้อราที่เกิดขึ้นบนผลลำไย และแสดงลักษณะอาการของผลที่เกิดโรคดังกล่าวมาแยกเชื้ออีกครั้ง เพื่อให้ทราบว่าเชื้อที่ปลูกถ่ายสามารถทำให้เกิดโรคได้จริงและเป็นเชื้อเดิม โดยนำเชื้อที่เกิดขึ้นบนผลลำไยมาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และถ่ายเชื้อ (Subculture) อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) เก็บไว้บนหลอดอาหารเอียง (Slant) และนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

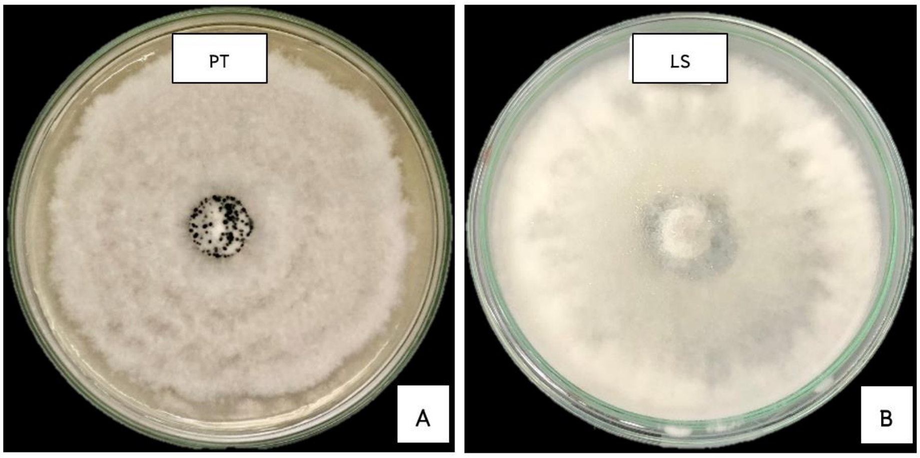


ภาพ 8 ลักษณะของผลลำไยที่เกิดอาการของโรคกับชุดควบคุม

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ ชุดควบคุมวางด้วยชิ้นส่วนอาหาร PDA,
B และC คือ ชุดทดลองที่วางด้วยชิ้นส่วนของเชื้อราทดสอบ

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเรียบร้อยแล้ว นำเชื้อราที่คาดว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรค มาศึกษาเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อ โดยนำเชื้อราที่ต้องการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo microscope เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนี สี ลักษณะการเจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาพ 9) พบว่าลักษณะของโคโลนีบนจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ของเชื้อราไอโซเลท PT มีลักษณะของเส้นใยสีขาวแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ตรงกลางโคโลนีจะมีการสร้าง

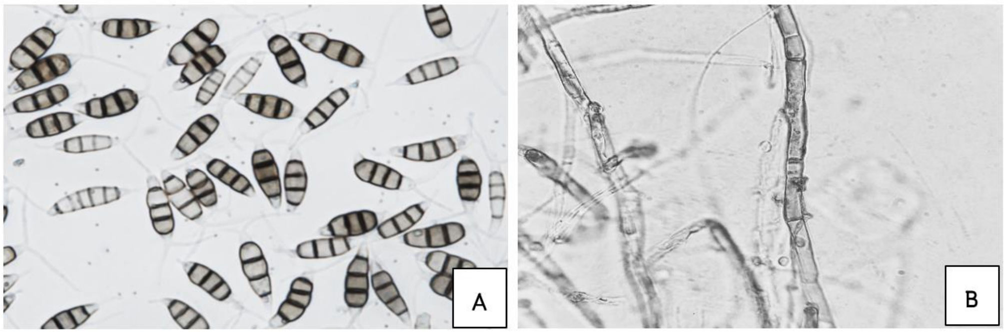
ของเหลวสีดำคล้ายหยดน้ำ ส่วนลักษณะของโคโลนีบนจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ของเชื้อราไอโซเลท LS มีลักษณะของเส้นใยฟูสีขาวถึงเทาอ่อน เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อ เขี่ยเส้นใยของเชื้อราวางบนแผนสไลด์ที่หยด Lactophenol cotton blue ปิดทับด้วย cover slips แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพ 10)



ภาพ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ เชื้อราทดสอบ (ไอโซเลท PT)

B คือ เชื้อราทดสอบ (ไอโซเลท LS)



ภาพ 10 ลักษณะของเส้นใย และสปอร์เชื้อรา ที่กำลังขยาย 40X

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ เชื้อราทดสอบ (PT), B คือ เชื้อราทดสอบ (LS)

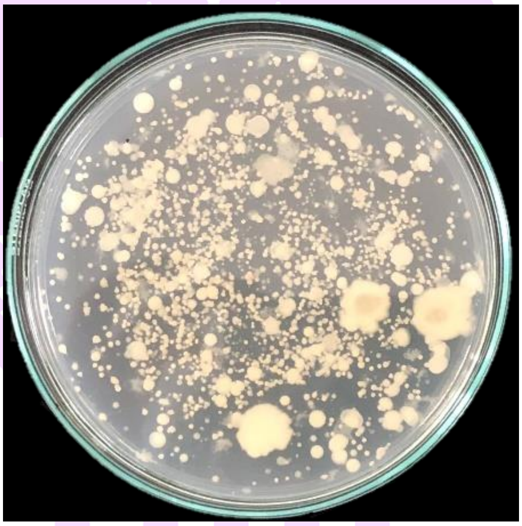
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งแบบ stereo microscope และแบบ compound microscope พบว่าทั้งสองเชื้อราที่คัดแยกได้ คือเชื้อราทดสอบไอโซเลท PT มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อราทดสอบไอโซเลท LS มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. มีลักษณะของโคโลนีบนจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และลักษณะของเส้นใย นอกจากนี้ยังรวมถึงรวมถึงลักษณะของสปอร์เชื้อรา ที่เหมือนกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp. ตามลำดับ จึงนำเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวไปศึกษาต่อไป

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย พบว่า เมื่อนำตัวอย่างใบลำไยที่ไม่เกิดโรคมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask) ที่มีน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 90 ml. แล้วทำการเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution method ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8} เท่า ดูดเอาสารละลายมา 100 µl หยดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (glass spreader microbiology) ด้วยวิธี spread plate จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพ 11)

ภาพ 11 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากใบลำไยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8})

เมื่อทำการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณแปลงปลูกลำไย พบว่า เมื่อนำตัวอย่างดินบริเวณแปลงปลูกลำไยปริมาณ 10 g. ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ที่มีน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 100 ml. เขย่า แล้วทำการเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilution method ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-8} ดูดเอาสารละลายมา 100 µl. หยดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (glass spreader microbiology) ด้วยวิธี spread plate จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพ 12)



ภาพ 12 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจากดินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-8})

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์แล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวอีกครั้ง ด้วยวิธี cross streak ลงบนจานอาหาร Nutrient agar (NA) และ พบว่าสามารถแยกเชื้อจากทั้งบริเวณใบ และดินบริเวณแปลงปลูกได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลท โดยโคโลนีส่วนใหญ่ที่พบมีโคโลนีขนาดเล็ก พบถึง 51.72% (ขนาดมากกว่า 0.3 mm.) ลักษณะขอบโคโลนีส่วนใหญ่เป็นขอบเรียบ พบ 68.97% ลักษณะที่พบมีทั้งโคโลนีที่มีสีขาวขุ่น สีขาวใส สีเหลือง และสีเหลืองใส ซึ่งลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ สรุปและแสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะทางกายภาพที่พบของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากใบ และดิน

ลำดับ	ลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์		ลักษณะที่พบ (%)
1	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	ใหญ่ ≥ 1	22.41%
		กลาง ≥ 0.8	25.86%
		เล็ก ≥ 0.3	51.72%
2	ลักษณะขอบโคโลนี	ขอบหยัก	31.03%
		ขอบเรียบ	68.97%
3	ลักษณะเนื้อผิวโคโลนี	ผิวมัน	48.28%
		ผิวด้าน	51.72%
4	ลักษณะผิวโคโลนี	ผิวขรุขระ	28.45%
		ผิวเรียบ	71.55%
5	สีโคโลนี	สีขาวขุ่น	78.45%
		สีขาวใส	10.34%
		สีเหลือง	5.17%
		สีเหลืงใส	0.86%

จากนั้นนำเชื้อไอโซเลทเดี่ยวที่ได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) เป็นแบบเอียงในหลอดทดลอง (slant) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญครบเวลาที่กำหนดให้พันปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม และเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่า ด้วยวิธี Dual culture

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกมาจากบริเวณผิวใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย

การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกมาจากบริเวณผิวใบ และดินบริเวณบริเวณแปลงปลูกลำไย ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual Culture (A. M. Skidmore และC. H. Dickinson 1976) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยทดสอบความสามารถของแบคทีเรียทั้ง 120 ไอโซเลทที่แยกมาได้จากผิวใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย

การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 120 ไอโซเลท ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. ทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) โดยชุดควบคุมที่ใช้จะเลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. เพียงอย่างเดียว บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar (PDA) ส่วนชุดทดสอบจะเลี้ยงเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการแยกได้ 1 ไอโซเลทต่อจาน บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจะทำการวัดความยาวรัศมีของเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับจานอาหารที่ไม่ได้เลี้ยงคู่กับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ภาพ 11 และภาพ 12) และวัดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ซึ่งคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้จากสูตร (A. Gamaliel, J. Katan และE. Conen, 1989)

ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $[(R1-R2)/R1] \times 100$

ซึ่ง R1 คือรัศมีของเชื้อราไม่ได้เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ (control) R2 คือ รัศมีของเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ โดยที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีประสิทธิภาพภาพนั้น จะทำการประเมินค่าประสิทธิภาพการยับยั้ง ดังนี้ (วาสนา เนียมแสวง, 2562)

มีค่าการยับยั้งมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ 61-79 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ 51-60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

มีค่าการยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

ซึ่งผลการทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. แสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 สรุปค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture ของแบคทีเรียทั้งหมด 120 ไอโซเลท

ลำดับ	เกณฑ์ประเมินค่าประสิทธิภาพการยับยั้ง (%)	ผลการทดสอบแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.	ผลการทดสอบแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp.
1	มากกว่า 80 %	-	-
2	61-79 %	10 %	5 %
3	51-60 %	10 %	10 %
4	น้อยกว่า 50 %	80 %	85 %

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. นั้น พบว่า มีแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค ที่มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ 61-79 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมีอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการทดสอบกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และมีอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ในการทดสอบกับเชื้อเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งแสดงให้เห็นในตาราง 2

แบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคที่อยู่ในเกณฑ์การประเมินค่าประสิทธิภาพมีค่าการยับยั้งอยู่ที่ 61-79 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงนั้น พบว่า เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากดินบริเวณแปลงปลูกลำไย คือ ไอโซเลท S050 ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. อยู่ที่ 72.67 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท S067 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. อยู่ที่ 70.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงไว้ในตาราง 3 และตาราง 4

ตาราง 3 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture

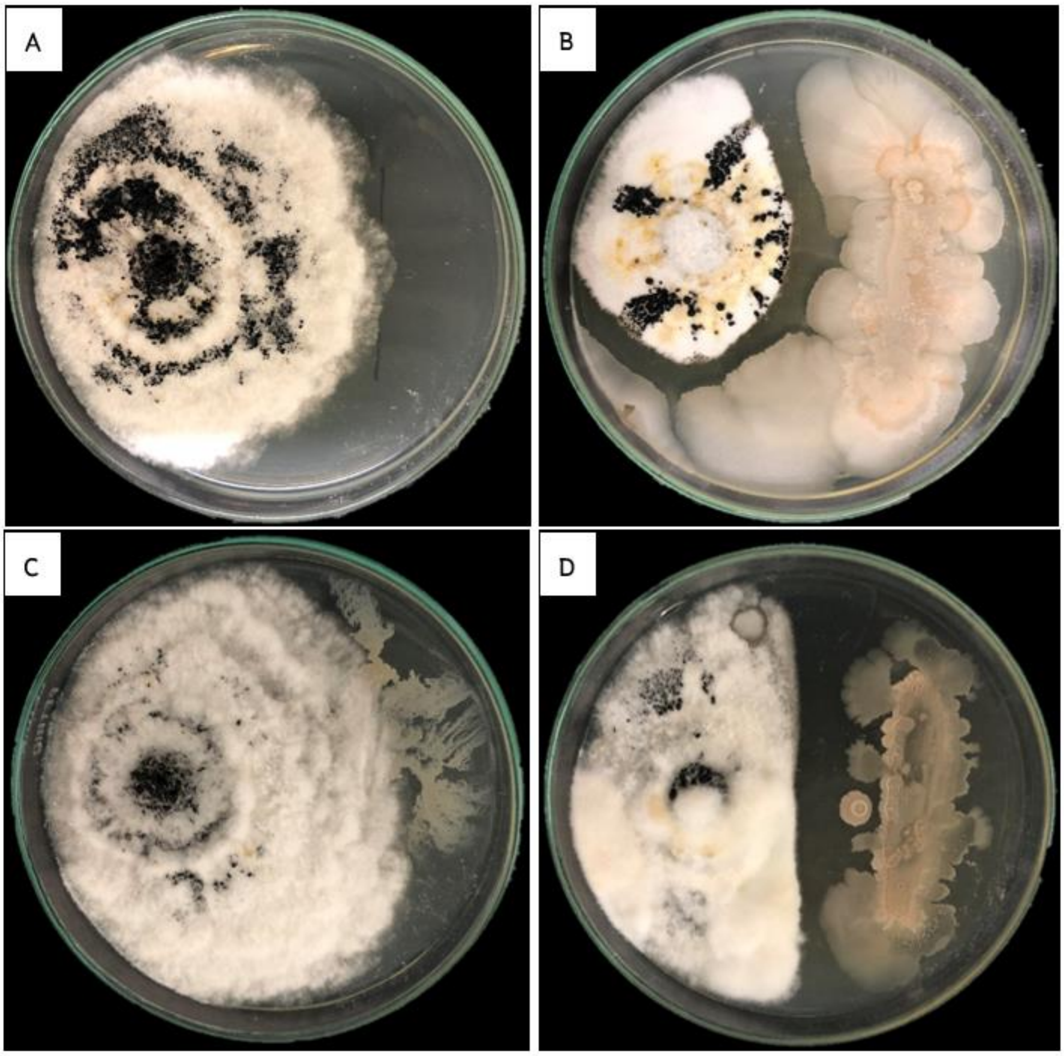
ชุดการทดลอง	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (%)
ชุดควบคุม*	–
แบคทีเรียไอโซเลท S050	72.67 ± 2.31^{a}
แบคทีเรียไอโซเลท S054	61.33 ± 1.15^{b}
แบคทีเรียไอโซเลท S067	52.00 ± 3.46^{c}

หมายเหตุ: อักษร a, b, c ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

* คือ ชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว

– คือ ไม่มีการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

จากตาราง 3 พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ทำการแยกจากดินบริเวณแปลงปลูก เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรค เปรียบเทียบกับผลทดสอบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (ภาพ 13A) พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่ปรากฏลักษณะการต้านทานการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. คือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S050 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ 72.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 13B) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ลองลงมาคือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S054 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ 61.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 13D) และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S067 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ 52.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) (ภาพ 13C)



ภาพ 13 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual culture

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ ชุดควบคุมที่ทำการเลี้ยงเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (Control)

B คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S050

C คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S067

D คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S054

ตาราง 4 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp.โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Dual culture

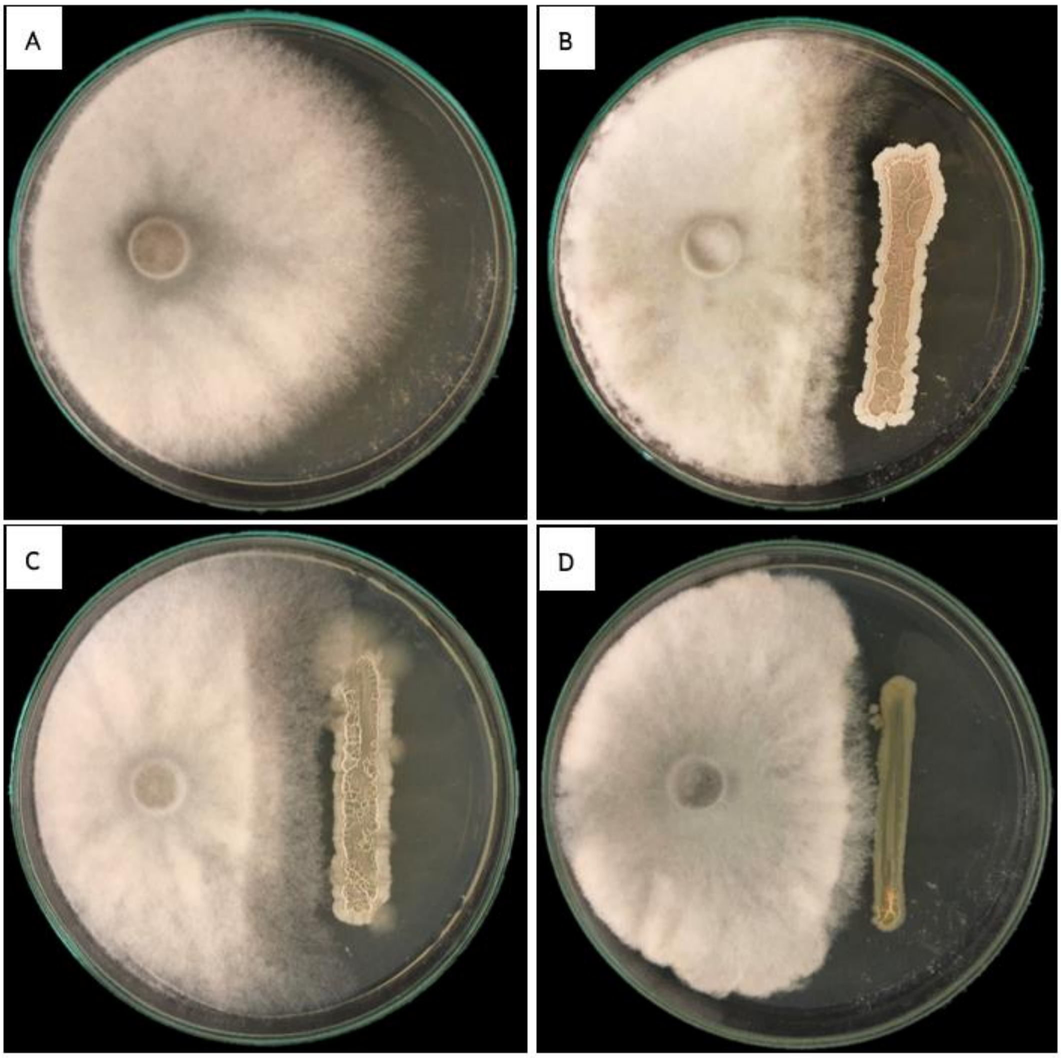
ชุดการทดลอง	**การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (%)**
ชุดควบคุม*	–
แบคทีเรียไอโซเลท S054	51.85 ± 6.42^{b}
แบคทีเรียไอโซเลท S061	52.60 ± 5.13^{b}
แบคทีเรียไอโซเลท S067	70.37 ± 1.28^{a}

หมายเหตุ: อักษร a, b, c ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

* คือ ชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว

– คือ ไม่มีการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

จากตาราง 4 พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ทำการแยกจากดินบริเวณแปลงปลูก เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับผลทดสอบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (ภาพ 14A) พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่ปรากฏลักษณะการต้านทานการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp.คือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S067 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ 70.37 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 14B) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงลองลงมาคือ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S061 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ 52.60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 14D) และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S054 สามารถต้านทานต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ 51.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) (ภาพ 14C)



ภาพ 14 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ด้วยวิธี Dual culture

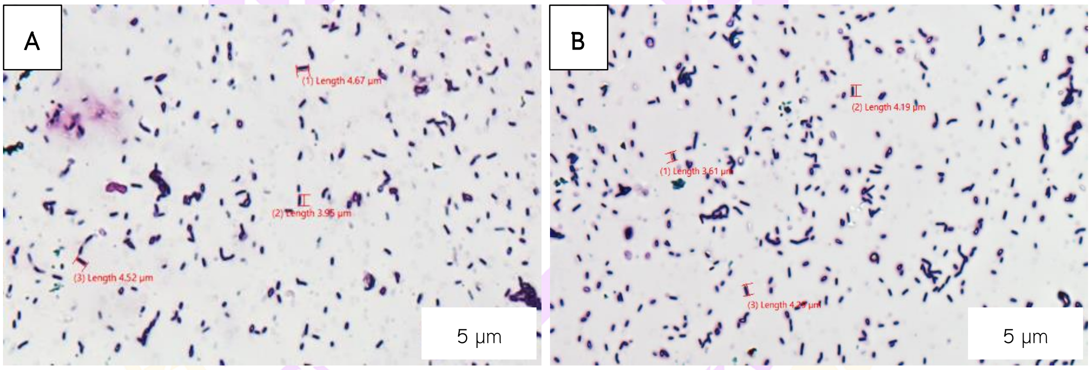
หมายเหตุ: โดยที่ A คือ ชุดควบคุมที่ทำการเลี้ยงเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (Control)

B คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S067

C คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S054

D คือ การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคร่วมกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S061

จากการทดสอบความสามารถเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หรือ *Lasiodiplodia* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dual culture สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในลำไยได้ 2 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง คือ ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 ตามลำดับ นำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท S050 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥0.8 mm ที่อายุ 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะขอบหยัก ผิวด้าน ลักษณะผิวโคโลนีขรุขระ และไอโซเลท S067 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥1.0 mm ที่อายุ 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะขอบหยัก ผิวด้าน ลักษณะผิวโคโลนีเรียบ นำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ด้วยวิธีการย้อมแกรมที่อายุเซลล์ 24 ชั่วโมง (ภาพ 15) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท S050 (ภาพ 15A) และแบคทีเรียไอโซเลท S067 (ภาพ 15B) ดังกล่าว เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet พบว่า เซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน (Rod shape) ไม่ทำให้เซลล์โป่ง ไม่มีการสร้างแกรนูล (Granule) และย้อมสีเอนโดสปอร์ที่อายุเซลล์ 48 ชั่วโมง

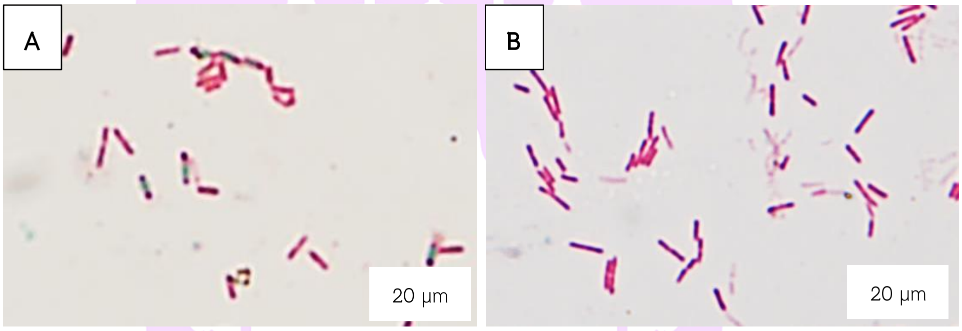


ภาพ 15 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ที่อายุ 24 ชั่วโมง เซลล์ติดสีแกรมบวก

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท S050 ติดสีแกรมบวก

B คือ ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท S067 ติดสีแกรมบวก

นำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่อายุเซลล์ 48 ชั่วโมง ย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีการสร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) ที่มีรูปร่างวงรี ซึ่งเซลล์ติดสีแดงของ aqueous safranin ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green (ภาพ 16) เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการศึกษาตามหนังสือ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (J. G. Holt และคณะ, 1994) พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp. จึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อแยกแบคทีเรียออกเป็นสองกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp.



ภาพ 16 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียจากการย้อมเอนโดสปอร์ ที่อายุ 48 ชั่วโมง โดยที่ลูกศรสีแดงชี้ในส่วนของเอนโดสปอร์

หมายเหตุ: โดยที่ A คือ ลักษณะของเซลล์ และรูปร่างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 ที่อายุ 48 ชั่วโมง จากการย้อมเอนโดสปอร์ และ B คือ ลักษณะของเซลล์ และรูปร่างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลท S067 ที่อายุ48 ชั่วโมง จากการย้อมเอนโดสปอร์

การย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่มีรูปร่างวงรี ซึ่งเซลล์จะติดสีแดงของ aqueous safranin ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มาทดสอบ Strict anaerobes ซึ่งเป็นการทดสอบการเจริญใน anaerobic agar ซึ่งผลที่ได้คือ ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ (–) จึงแยกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ออกจากกลุ่มของ *Clostridium* spp. ได้อย่างชัดเจน ตามหนังสือ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (J. G. Holt และคณะ, 1994) และจัดว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 มีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกับกลุ่มของ *Bacillus* spp. แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบยังไม่สามารถจัดกลุ่มย่อยของ *Bacillus* spp. ตามสัณฐานวิทยาได้ จึงนำมาทดสอบคุณสมบัติทาง

ชีวเคมีตามหนังสือ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (J. G. Holt และคณะ, 1994) ในการทดสอบจีนัส *Bacillus* spp. และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับคุณสมบัติทางชีวเคมีตามข้อมูลในหนังสือดังกล่าว เพื่อระบุจีนัสของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

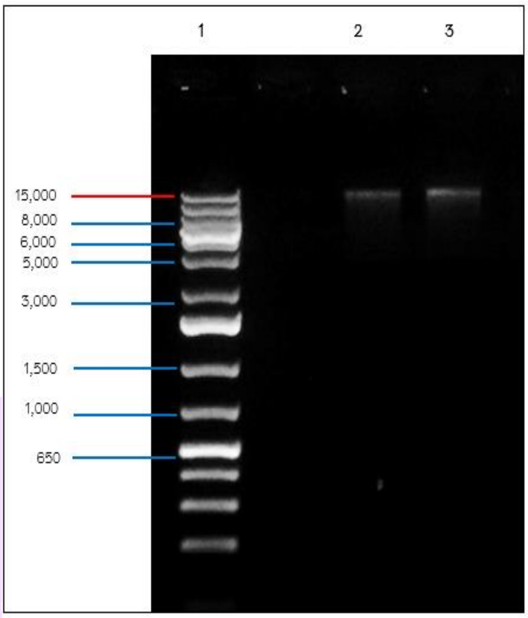
นำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 ดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch Hydrolysis) หากแบคทีเรียที่มี amylase ซึ่งเป็น extracellular enzyme จะสามารถย่อยสลายแป้งให้มีขนาดที่เล็กลงได้เป็น glucose maltose oligosaccharides และ dextrin การทดสอบจะไม่สามารถเกิดสีน้ำเงิน–ม่วง กับสารละลายไอโอดีนได้ ซึ่งผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก (+) เกิดวงใสรอบ ๆ บริเวณแบคทีเรีย และนำไปทดสอบ Vogas–Proskauer test (VP test) เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง acetyl–methyl carbinol (acetoin) จาก glucose เมื่อเติม potassium hydroxide 40% (KOH) ลงไป เกิดสีแดงส้มจะให้ผลการทดสอบเป็นบวก (+) ซึ่งจากการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (+) นำมาศึกษาขนาดของเซลล์ (Cell Diamenter) ซึ่งพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท S050 มีขนาดของเซลล์กว้าง 4.38 µm และไอโซเลท S067 มีขนาดของเซลล์กว้าง 4.03 µm ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก (+) จึงนำไปทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลการทดสอบ citrate test ให้ผลเป็นบวก (+) สีของ indicator เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปทดสอบ 6.5% NaCl Growth test จากการทดสอบเชื้อที่สามารถทนต่อความเข้มข้นนี้ได้จะเจริญ และใช้น้ำตาลกลูโคสได้ จะเปลี่ยนสี Bromcresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองมีผลการทดสอบเป็นบวก (+) แต่ผลการทดสอบของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังนำไปทดสอบ Indole ซึ่งให้ผลเป็นลบ (–) ทั้ง 2 ไอโซเลท และการทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) และ Catalase test ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก (+) ทั้ง 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แสดงผลการทดสอบไว้ในตาราง 5 จากการทดสอบทางชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีลักษณะจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. จึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มาจัดจำแนกสายพันธุ์ ด้วยวิธีทาง Molecular Biology เพื่อยืนยันผลต่อไป

ตาราง 5 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

คุณสมบัติ	ไอโซเลท		
	S050	S067	*Bacillus* spp.
Gram stain	+	+	+
Cell shape	ท่อน	ท่อน	ท่อน
Endospore	+	+	+
Streak anaerobe	–	–	–
Starch medium	+	+	+
OF test	–	–	–
VP test	+	+	+
Citrate test	+	+	+
SIM test			
– Indole	–	–	–
– Motility	+	+	+
Catalase test	+	+	+
6.5% NaCl	–	–	–

หมายเหตุ: (+) คือ ให้ผลเป็นบวก, (–) คือ ให้ผลเป็นลบ, Gram stain (+) คือ เซลล์ติดสีแกรมบวก สีม่วง, Endospore (+) คือ เซลล์มีการสร้างเอนโดสปอร์

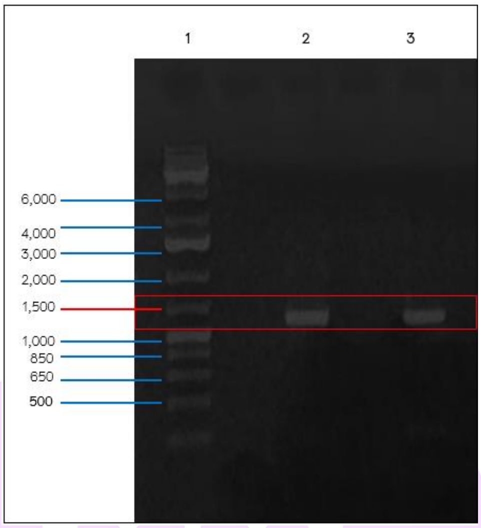
การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธีทาง Molecular Biology โดยการนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 จากการตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาเบื้องต้น และคุณสมบัติทางชีวเคมีนั้น พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จึงนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทมาสกัด genomic DNA ของแบคทีเรีย (ภาพ 17) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับทำ PCR (polymerase chain reaction)



ภาพ 17 genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067

หมายเหตุ: โดยที่ แถวที่ 1 คือ 1 kb plus DNA ladder, แถวที่ 2 คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแถวที่ 3 คือ แบคทีเรียไอโซเลท S067

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) นำ genomic DNA ของทั้ง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ความเข้มข้น 10 ng/µl ใช้ primer 8F [5’– AGAGTTTGATCMTGGCTCAG –3’] และ 1522R [5’AAGGAGGTGATCCRCCGCA–3’] (Eduardo N. Esteban และคณะ, 2012) ซึ่งองค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR มีลำดับขั้นตอนดังนี้ Intial denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 รอบ 1 นาที Denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตั้งแต่ขั้นตอน Denature จนถึง Extension ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 รอบ 10 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี Electrophoresis หลังจากนั้น จะนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแม่แบบ ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ปตรวจสอบ PCR product ด้วย Agarose electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาด 1,500 bp เมื่อใช้ primer 8F และ 1522R ดังแสดงในภาพ 18



ภาพ 18 PCR product ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 โดยใช้ primer 8F และ 1522R พบขนาด PCR product ขนาด 1,500 bp

หมายเหตุ: โดยที่ แถวที่ 1 คือ 1 kb plus DNA ladder, แถวที่ 2 คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแถวที่ 3 คือ แบคทีเรียไอโซเลท S067

เมื่อทราบขนาด PCR product ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดแล้ว คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 นำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้ โดยนำส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ที่บริษท First BASE Laboratories. ประเทศมาเลเซีย ซึ่งได้ลำดับเบสของแบคทีเรีย ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 (ภาพ 19) และแบคทีเรียไอโซเลท S067 (ภาพ 20)

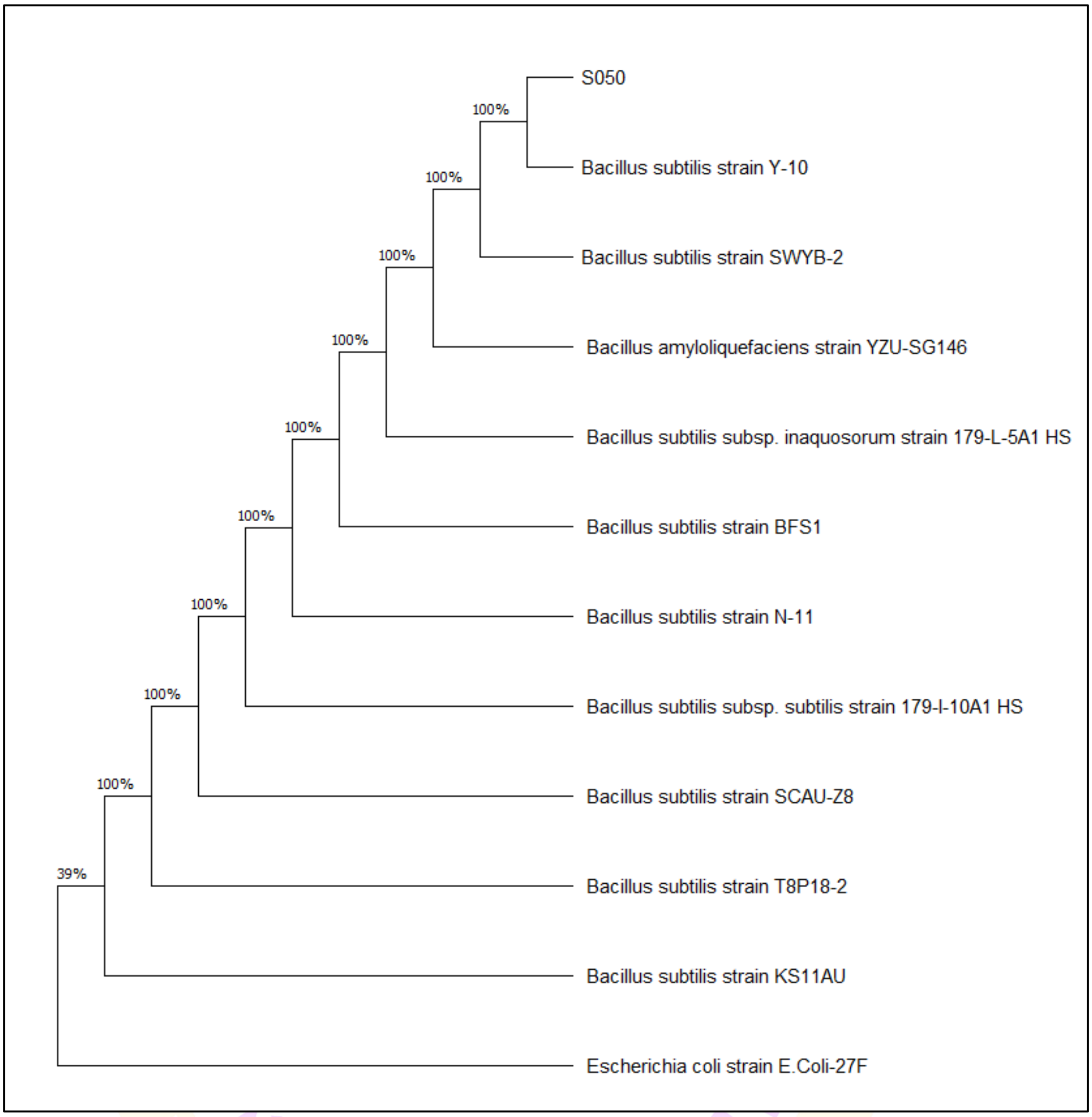
```
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG
GCAGAGT
```

ภาพ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050

AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCT
TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAA
GAGGAGAGT

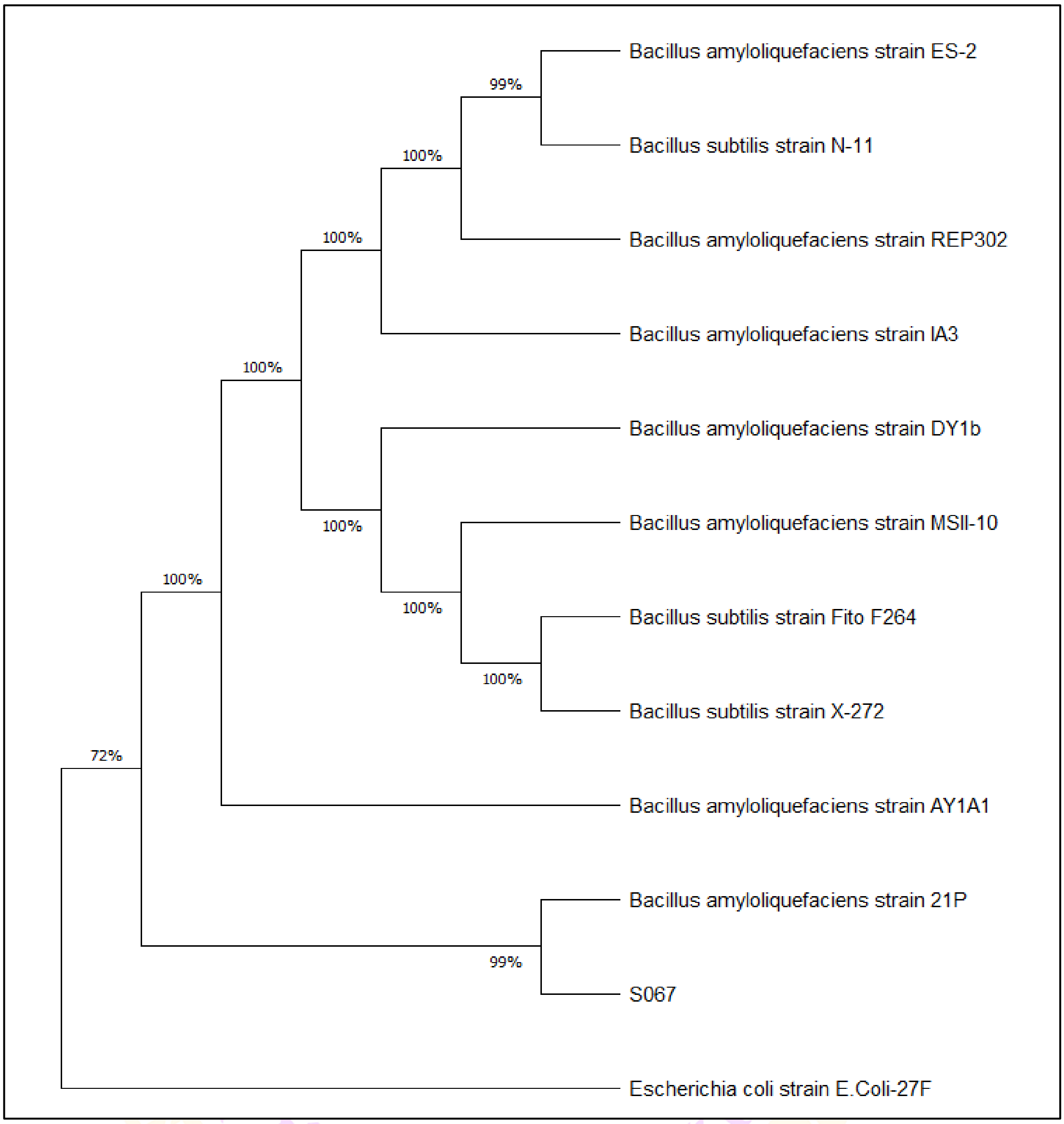
ภาพ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท S067

โดยนำบางส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ที่มีขนาด 376 bp ดังภาพ 19 และภาพ 20 มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ Basic local alignment search tool (BLAST) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท S050 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain Y-10 (Genbank: MW047293.1) โดยมีความเหมือนกันที่ (identity) 100% และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* strain 21P (Genbank: KM877236.1) โดยมีความเหมือนกันที่ (identity) 99.03% นำลำดับนิวคลีโอไทด์ มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีดอไทด์จากบริเวณ 16s rDNA โดยใช้วิธี clustalW multiple alignment ผลการเปรียบเทียบที่ได้ สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA version 10.0 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีไทด์จากฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI โดยมีแบคทีเรีย *E. coli* เป็น out group ซึ่งได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Genbank: MH282936.1 จาก NCBI แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 ในรูปแบบของ Phylogenitic Tree ดังแสดงในภาพ 21 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ในรูปแบบของ Phylogenitic Tree ดังแสดงในภาพ 22



ภาพ 21 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอ็นเอแบคทีเรียไอโซเลท S050 ในรูปแบบของ Phylogenetic Tree โดยใช้โปรแกรม MEGA Version 10.0

จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ที่แสดงในรูปแบบของ Phylogenetic Tree ของแบคทีเรียไอโซเลท S050 (ภาพที่ 21) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI เพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน พบว่า Phylogenetic Tree ที่ได้นั้น ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S050 มีความใกล้ชิดกับแบบทีเรีย *Bacillus subtilis* คือ *Bacillus subtilis* strain Y–10 (Genbank: MW047293.1) ซึ่งมีค่า Bootstrap 100% แสดงถึงความเชื่อมั่นของผลการวิเคราห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่ความเชื่อมั่นระดับสูง



ภาพ 22 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอ็นเอแบคทีเรียไอโซเลท S067 ในรูปแบบของ Phylogenetic Tree โดยใช้โปรแกรม MEGA Version 10.0

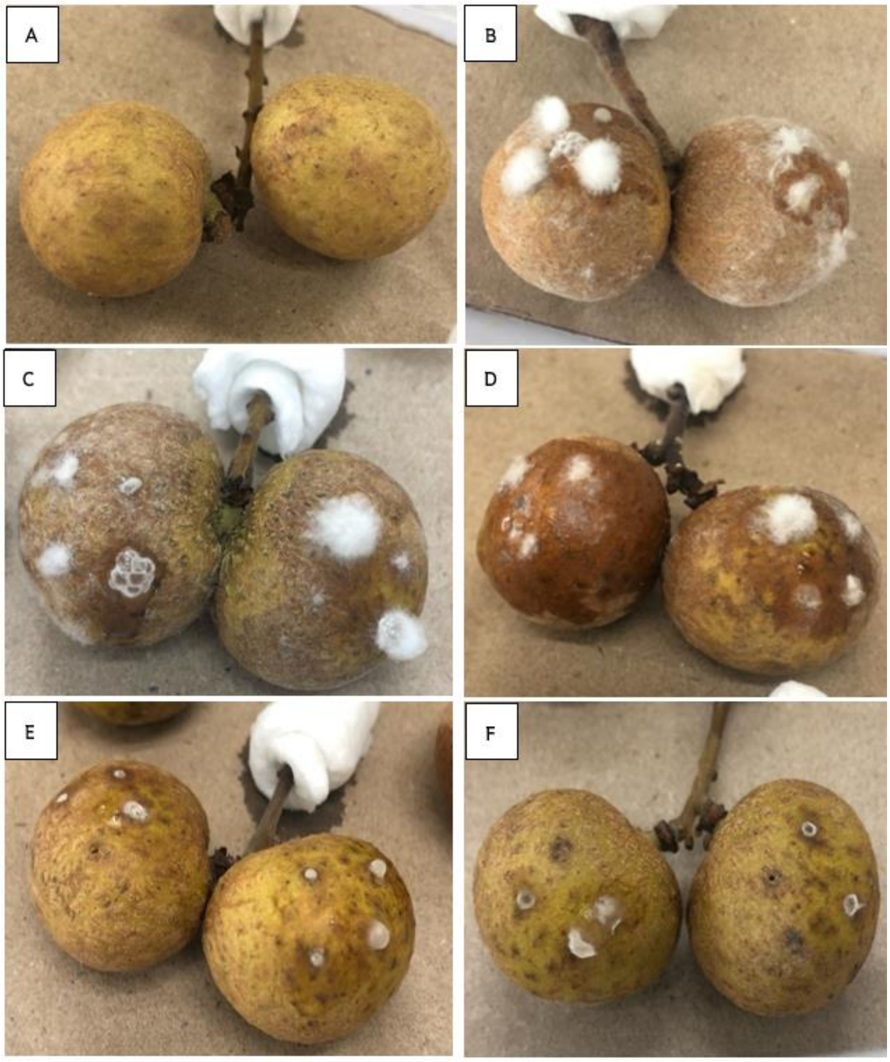
จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ที่แสดงในรูปแบบของ Phylogenetic Tree ของแบคทีเรียไอโซเลท S067 (ภาพที่ 22) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI เพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน พบว่า Phylogenetic Tree ที่ได้นั้น ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีความใกล้ชิดกับแบบทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* คือ *Bacillus amyloliquefaciens* strain 21P (Genbank: KM877236.1) ซึ่งมีค่า Bootstrap 99% แสดงถึงความเชื่อมั่นของผลการวิเคราห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่ความเชื่อมั่นระดับสูง

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่ฤทธิ์ต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคบนผลลำไย ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าบนลำไย ทำการวางแผนการทดลองโดยใช้การวางแผนทางสถิติ การทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลอง คือ ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่น ชุดที่ฉีพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (*Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.) ที่ความเข้มข้น 10^{6} spore/ml. เป็นชุดควบคุม ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้น 10^{2} cfu/ml ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้น 10^{4} cfu/ml ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้น 10^{6} cfu/ml และชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้น 10^{8} cfu/ml โดยปริมาณที่ใช้ในการฉีดพ่นลงบนผลลำไยแต่ละชุดการทดลอง คือ 20 มิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนผลไยที่มีการปลูกถ่ายเชื้อราสาเหตุโรค และทำการวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุก ๆ 3 วัน หลังจากการควบคุมโรคจนครบ 9 วัน ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเก็บข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

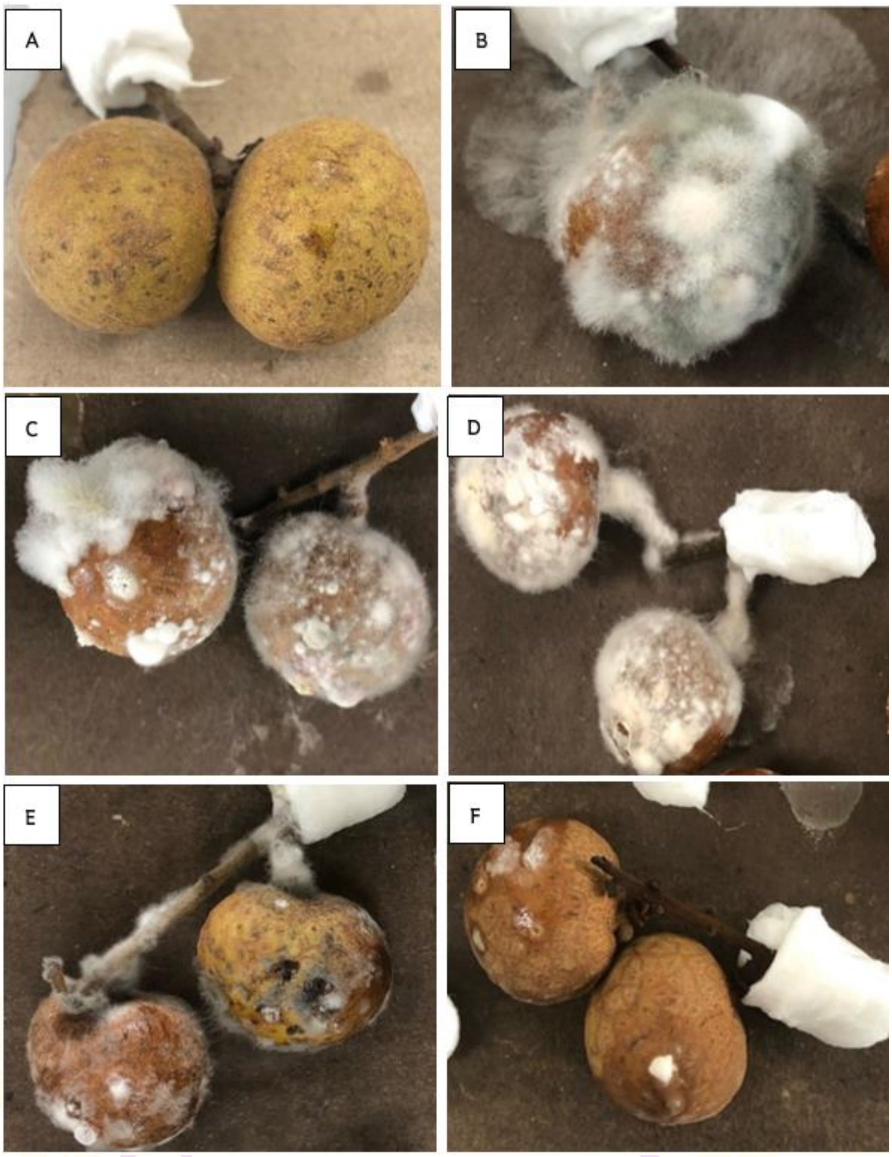
ผลการทดสอบ พบว่า การทดสอบด้วยชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (ชุดควบคุม) พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลของลำไยเฉลี่ยอยู่ที่ 77.50 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^{8} cfu/ml มีการเกิดโรคต่ำสุดอยู่ที่ 45 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^{2} cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 72.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^{4} cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 65 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^{6} cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการสังเกตการเกิดโรคทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 9 วัน ของการทดลอง ดังภาพ 23 นอกจากนี้การทดสอบด้วยชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. (ชุดควบคุม) พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลของลำไยเฉลี่ยอยู่ที่ 82.50เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^{8} cfu/ml มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุดอยู่ที่ 32.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^{2} cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 62.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ฉีดพ่นเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^{4} cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 52.5 เปอร์เซ็นต์

Lasiodiaplodia sp. กับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml มีการเกิดโรคอยู่ที่ 52.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการสังเกตการเกิดโรคทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 9 วัน ของการทดลอง ดังภาพ 24



ภาพ 23 การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Pestalotiopsis sp. สาเหตุโรคบนผลลำไยภายในห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: โดย A คือ ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่น, B คือ ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคผลเน่า, C คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^2 cfu/ml), D คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^4 cfu/ml), E คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลทS050 (10^6 cfu/ml), F คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^8 cfu/ml)



ภาพ 24 การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Lasiodiaplodia sp. สาเหตุโรคบนผลลำไยภายในห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: โดย A คือ ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่น, B คือ ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่า, C คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^2 cfu/ml), D คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^4 cfu/ml), E คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^6 cfu/ml), F คือ ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml)

จากภาพ 23 และภาพ 24 สามารถเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่าในลำไยได้อย่างชัดเจนว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 32.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ ทำให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml สามารถลดการเกิดโรคเน่าบนผลลำไยได้อย่างชัดเจน เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดที่ทำการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 77.5 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ 82.5 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. และชุดควบคุมที่ไม่มีการพ่นเชื้อก่อโรค ไม่พบการเกิดโรคขึ้นบนผลของลำไยจากนั้นนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากการทำแผนภูมิแท่งไปวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 22 ซึ่งทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบที่มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนซ้ำเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range (Duncan) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในตาราง 6 และตาราง 7

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

ชุดการทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%)		
	3 วัน	6 วัน	9 วัน
ชุดไม่ฉีดพ่นเชื้อรา	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ชุดฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (10^6 spore/ml.)	60.00±8.17^{b}	67.50±25.00^{b}	77.50±17.08^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^2 cfu/ml)	62.50±9.57^{b}	70.00±18.26^{b}	72.50±5.00^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^4 cfu/ml)	55.00±10.00^{b}	60.00±14.14^{ab}	65.00±12.91^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^6 cfu/ml)	52.50±9.57^{b}	60.00±8.16^{ab}	60.00±8.16^{ab}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S050 (10^8 cfu/ml)	25.00±10.00^{a}	35.00±5.77^{a}	45.00±5.77^{a}

หมายเหตุ: อักษร a, b, ab ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ตาราง 7 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp.

ชุดการทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%)		
	3 วัน	6 วัน	9 วัน
ชุดไม่ฉีดพ่นเชื้อรา	0.00÷0.00	0.00÷0.00	0.00÷0.00
ชุดฉีดพ่นเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. (10^6 spore/ml.)	0.00÷0.00	75.00±17.32^{c}	82.50±12.58 ^{c}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^2 cfu/ml)	0.00÷0.00	55.00±5.77^{b}	62.50±5.00 ^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^4 cfu/ml)	0.00÷0.00	45.00±12.91^{b}	52.50±9.57 ^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^6 cfu/ml)	0.00÷0.00	45.00±12.91^{b}	52.50±9.57 ^{b}
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml)	0.00÷0.00	17.50±9.57^{a}	32.50±5.00 ^{a}

หมายเหตุ: อักษร a, b, ab ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

จากตารางการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Duncan) ในตาราง 6 เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุกับชุดการทดสอบทั้ง 5 ชุด พบว่า ชุดที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อรา และชุดที่ฉีดมีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่ความเข้มข้น 10^2, 10^4, 10^6 และ10^8 cfu/ml มีผลทำให้ผลของลำไยแสดงอาการของการเกิดโรคผลเน่าแตกต่างกันชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) นอกจากนี้ในตาราง 7 เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุกับชุดการทดสอบทั้ง 5 ชุด พบว่า ชุดที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อรา และชุดที่ฉีดมีการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่ความเข้มข้น 10^2, 10^4, 10^6 และ10^8 cfu/ml มีผลทำให้ผลของลำไยแสดงอาการของการเกิดโรคผลเน่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เช่นกัน แสดงว่าอิทธิพลของสิ่งทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ชุดที่ไม่มีการฉีดพ่นพ่นเชื้อราทั้งสองชนิด (ฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว) ไม่มีการแสดงผลการเกิดโรคบนผลลำไยเกิดขึ้น แต่ชุดฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (10^6 spore/ml.) และชุดฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml) มีความแตกต่างต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับชุดฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. (10^6 spore/ml.) และชุดฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทำให้เห็นว่าค่าความเข้มของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มีผลต่อการลดการเกิดโรคผลเน่าบนลำไยในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถลดการเกิดโรคได้แล้ว ซึ่งอยู่ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองมาทดสอบในระดับแปลงปลูกเพื่อดูเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่าต่อไป

การทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคบนต้นลำไย ในแปลงปลูกพื้นที่วิสาหกิจชุมชนบ้านต๋ำ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในลำไยระดับแปลงปลูก ทำการใช้พื้นที่แปลงปลูกลำไยวิสาหกิจชุมชนบ้านต๋ำ จังหวัดพะยา โดยวิธีการวางแผนการทดลองที่ทำการศึกษา คือ การวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) มีชุดการทดลองทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดที่ไม่ฉีดพ่นเชื้อรา (ฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่น) ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า (*Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.) ชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่ากับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (ชุดควบคุม) และชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่ากับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml (ไอโซเลท S050 และ S067)

การเกิดโรคบนผลลำไยในแปลงปลูกหลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค *Pestalotiopsis sp.* พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45–98.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุดในการเก็บผลการทดสอบครั้งที่ 1 (3 วัน) คือ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากนั้นพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เพิ่มมากขึ้น ในการเก็บผลการทดสอบครั้งที่ 2 (6 วัน) ครั้งที่ 3 (9 วัน) ครั้งที่ 4 (12 วัน) และครั้งที่ 5 (15 วัน) คือ 47.5 เปอร์เซ็นต์ , 69.38 เปอร์เซ็นต์, 93.13 เปอร์เซ็นต์ และ 98.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่เปรียบเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อ พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังจากการเก็บรักษา พบว่า ครั้งที่ 1 (3 วัน) และครั้งที่ 2 (6 วัน) ไม่พบการเกิดโรค ครั้งที่ 3 (9 วัน) ครั้งที่ 4 (12 วัน) และครั้งที่ 5 (15 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ เมื่อมีการควบคุมด้วยสารเคมี สำหรับชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรค *Pestalotiopsis sp.* กับเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 พบเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ครั้งที่ 1 (3 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 13.75 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 2 (6 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 15 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 3 (9 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 21.88 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 4 (12 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 34.38 เปอร์เซ็นต์ และครั้งที่ 5 (15 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 40.63 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าในลำไย โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 40.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงถึง 98.13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเก็บรักษาผลของลำไยเป็นระยะเวลา 15 วัน

นอกจากนี้ชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค *Lasiodiaplodia sp.* พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 48.13-98.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุดในการเก็บผลการทดสอบครั้งที่ 1 (3 วัน) คือ 48.13 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากนั้นพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เพิ่มมากขึ้น ในการเก็บผลการทดสอบครั้งที่ 2 (6 วัน) ครั้งที่ 3 (9 วัน) ครั้งที่ 4 (12 วัน) และครั้งที่ 5 (15 วัน) คือ 76.25 เปอร์เซ็นต์, 89.38 เปอร์เซ็นต์, 95 เปอร์เซ็นต์ และ 98.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อ พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังจากการเก็บรักษา พบว่า ครั้งที่ 1 (3 วัน) และครั้งที่ 2 (6 วัน) ไม่พบการเกิดโรค ครั้งที่ 3 (9 วัน) ครั้งที่ 4 (12 วัน) และครั้งที่ 5 (15 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ เมื่อมีการควบคุมด้วยสารเคมี สำหรับชุดที่ฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรค *Lasiodiaplodia sp.* กับเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ครั้งที่ 1 (3 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 18.13 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 2 (6 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 25.36 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 3 (9 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.13 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 4 (12 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 46.25 เปอร์เซ็นต์ และครั้งที่ 5 (15 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45.63 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าในลำไยโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 45.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงถึง 98.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเก็บรักษาผลของลำไยเป็นระยะเวลา 15 วัน

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทำแผนภูมิแท่งไปวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 22 ซึ่งทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบที่มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (Duncan) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในตาราง 8 และตาราง 9

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ S050 ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในแปลงปลูกลำไย

ชุดการทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%)				
	3 วัน	6 วัน	9 วัน	12 วัน	15 วัน
ชุดไม่ฉีดพ่นเชื้อรา	00.00±00.00	05.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]
ชุดฉีดพ่นด้วยสารเคมีเปรียบเทียบ	00.00±00.00	00.00±00.00	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]
ชุดฉีดพ่นเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรค	45.00±4.63[b]	47.50±2.67[b]	69.38±6.23[b]	93.13±7.99[b]	98.13±3.72[b]
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 (10^8 cfu/ml)	13.75±4.43[a]	15.00±3.78[a]	21.88±5.30[a]	34.38±6.23[a]	40.63±6.78[a]

หมายเหตุ: อักษร a, b, c ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ S067 ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในแปลงปลูกลำไย

ชุดการทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%)				
	3 วัน	6 วัน	9 วัน	12 วัน	15 วัน
ชุดไม่ฉีดพ่นเชื้อรา	00.00±00.00	05.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]
ชุดฉีดพ่นด้วยสารเคมีเปรียบเทียบ	00.00±00.00	00.00±00.00	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]	10.00±00.00[c]
ชุดฉีดพ่นเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. สาเหตุโรค	48.13±7.53[b]	76.25±13.82[b]	89.38±10.84[b]	95.00±7.07[b]	98.75±2.31[b]
ชุดฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml)	18.13±6.51[a]	25.63±8.21[a]	33.13±7.53[a]	46.25±4.43[a]	45.63±4.17[a]

หมายเหตุ: อักษร a, b, c ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

จากตาราง 8 และตาราง 9 สามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ว่า การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักทั้ง 2 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียไอโซเลท S050 ในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนลำไย คือ *Pestalotiopsis* sp และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนลำไย คือ *Lasiodiplodia* sp. ในการควบคุมโรคบนผลลำไยในแปลงปลูกลำไย ทำให้เห็นว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp และ *Lasiodiplodia* sp. บนต้นลำไยภายในแปลงปลูก จะเห็นได้ว่าการควบคุมโรคด้วยชุดการควบคุมที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชุดการทดลองคือ ชุดที่ไม่มีการฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรค ชุดที่มีการฉีดพ่นสารเคมี ชุดที่มีการฉีดพ่นด้วยเชื้อราสาเหตโรค *Pestalotiopsis* sp และ *Lasiodiplodia* sp. และชุดที่มีการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml หลังจากการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 15 วัน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลง และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค พบว่า ชุดที่มีการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 (10^8 cfu/ml) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ 40.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค *Pestalotiopsis* sp ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ 98.13 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตาราง 8) เช่นเดียวกันกับ ชุดที่มีการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 (10^8 cfu/ml) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ 45.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ 98.75 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตาราง 9) ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่มีการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพที่ทำให้เกิดโรคต่ำ

การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ และการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย

การตรวจวัดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยหลังจากการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอเลท S067 ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 โดยสุ่มเก็บลำไยที่พ่นเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทมาตรวจสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และคำนวนหาปริมาณเชื้อที่พบในแต่ละความเจือจาง (10^{-3} ถึง 10^{-6} เท่า) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

จากการคำนวนหาปริมมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่า ชุดการทดสอบ 1 (ชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050) พบปริมาณเชื้อราจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมากสุด คือ 1.82×10^{6} cfu/ml และชุดการทดสอบ 2 (ชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067) มีพบปริมาณเชื้อราจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมากสุด คือ 2.36×10^{6} cfu/ml ซึ่งได้แสดงผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการฉีดพ่นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไว้ใน ตาราง 10

ตาราง 10 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังจากการฉีดพ่น (CFU/ml) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดสอบ	จำนวนเซลล์ที่พบ (cfu/ml)
1	1.82×10^{6}
2	2.36×10^{6}

หมายเหตุ: ชุดการทดสอบ 1 คือ สารแขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ S050
ชุดการทดสอบ 2 คือ สารแขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ S067

จากการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย ใช้วิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยสุ่มเก็บผลลำไยที่พ่นเชื้อปฏิปักษ์ มาแยกเชื้อปฏิปักษ์อีกครั้ง ซึ่งสามารถแยกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลท มาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลท กับเชื้อที่แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกได้ทั้ง 2 โซเลท คือแบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 พบว่า ลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และขนาดของเซลล์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และไอโซเลทS067 ที่ทำการฉีดพ่นลงบนผลลำไยภายในแปลงปลูก มีความสามารถในการมีชีวิตรอด และเข้าอาศัยภายในผลลำไยได้

บทที่ 5
บทสรุป

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า สามารถแยกเชื้อรา *Pastalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ได้จากบริเวณเปลือกผลของลำไยที่ปรากฏอาการโรคเน่า ซึ่งบริเวณเปลือกผลจะมีลักษณะอาการคือผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ อาการเปลือกแตกบริเวณผลลำไย เกิดจุดสีดำขนาดเล็กบนเปลือกผลของลำไย การแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิค Tissue Transplanting Technique พบว่า ลักษณะของโคโลนีเชื้อราไอโซเลท PT มีลักษณะของเส้นใยสีขาวแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร โคโลนีจะมีการสร้างของเหลวสีดำคล้ายหยดน้ำ ส่วนลักษณะของโคโลนีเชื้อราไอโซเลท LS มีลักษณะของเส้นใยฟูสีขาวถึงเทาอ่อนเมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ตามวิธีของ Koch (Koch's postulates) พบว่า ผลของลำไยเป็นสีน้ำตาลบริเวณขั้วผล เชื้อรามีการเข้าไปทำลายบริเวณผลของลำไยมีลักษณะอาการผลเน่า นำเชื้อราทั้งสองไอโซเลทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะเหมือนกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ที่แยกได้จำนวน 120 ไอโซเลท ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ*Lasiodiplodia* sp. ด้วยวิธี Dual culture (A. M. Skidmore และC. H. Dickinson 1976) พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S050 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. มีค่า 72.67 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท S067 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. มีค่า 70.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งในระดับสูง (วาสนา เนียมแสวง, 2562) การจำแนกสายพันธุ์ทางชีวเคมี ตามข้อมูลในหนังสือ Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (J. G. Holt และคณะ, 1994) และการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* spp. และนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular biology) เพื่อยืนยันผล และเปรียบเทียบกับข้อมูลของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI โดยแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบของ Phylogenetic Tree พบว่า ลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท S050 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain Y-10 (Genbank: MW047293.1) ซึ่งมีค่า Bootstrap 100% และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีความใกล้ชิด

กับแบบทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* strain 21P (Genbank: KM877236.1) ซึ่งมีค่า Bootstrap 99% แสดงถึงความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ความเชื่อมั่นระดับสูง

การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับห้องปฏิบัติการ และในระดับแปลงปลูกของเกษตรกร โดยการทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าบนลำไย ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ทำให้เกิดโรคต่ำสุดอยู่ที่ 45 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุดอยู่ที่ 32.5 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตการเกิดโรคทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน ของการทดลอง และการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในลำไย ในระดับแปลงปลูกของเกษตรกร พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 40.63 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 45.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเก็บรักษาผลของลำไยเป็นระยะเวลา 15 วัน

การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชุดการทดสอบ 1 (ชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S050) พบปริมาณเชื้อราจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมากสุด คือ 1.82×10^6 cfu/ml และชุดการทดสอบ 2 (ชุดที่มีการฉีดพ่นเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S067) มีพบปริมาณเชื้อราจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมากสุด คือ 2.36×10^6 cfu/ml และจากการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย โดยใช้วิธีการแยกเชื้อกลับ พบว่า ลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และขนาดของเซลล์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 ที่ทำการฉีดพ่นลงบนผลลำไยภายในแปลงปลูก

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อรา *Pastalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. เป็นเชื้อราก่อโรคในพืช และเป็นเชื้อสาเหตุของโรคที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย มีอาการเน่าอย่างรุนแรงบนผลลำไยทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตลำไยได้หลังการเก็บเกี่ยว (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556) สามารถแยกได้จากบริเวณเปลือกผลของลำไยที่ปรากฏอาการโรคเน่า ซึ่งบริเวณเปลือกผลจะมีลักษณะอาการของลำไยที่มีผลแตก ผลลาย และอาการเน่าเสีย เปลือกผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ อาการเปลือกแตกบริเวณผลลำไย เกิดจุดสีดำขนาดเล็กบนเปลือกผลของลำไย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ขัดสงคราม ซึ่งรายงาน

ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเนาของลำไยหลังบ่มเชื้อเปนเวลา 3 วัน พบเสนใยของเชื้อราเจริญบริเวณผิวเปลือกขั้ว กานผลลำไย และเปลือกผลมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเขมขึ้นมีของเหลวสีน้ำตาลซึมออกมาจากภายในเมื่อนำมาเพาะเลี้ยง และแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจพบเชื้อรา 3 ชนิดไดแก่ *Pestalotiopsis* sp., *Lasiodiplodia* sp. และ *Trichothecium* sp. (เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ขัดสงคราม, 2555) โดยเชื้อรา *Pastalotiopsis* sp. มีลักษณะอาการของโรคคือ เปลือกผลมีรอยคล้ำสีน้ำตาล ลักษณะฉ่ำน้ำ มีของเหลวสีน้ำตาลซึมออกมาจากภายในเนื้อผลนิ่ม มีกลิ่นฉุน พบเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญบริเวณผิวเปลือก และขั้วผล ลักษณะภายในผล เปลือกด้านในมีสีน้ำตาล เนื้อลำไยยุบตัว มีสีขาวขุ่นถึงสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี (colony) เส้นใยมีสีขาวแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร บริเวณกลางโคโลนีจะมีการสร้างของเหลวคล้ายหยดน้ำสีดำ เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body) แบบอะเซอวูลัส (acervulus) โคนิเดีย (conidia) ภายในอะเซอวูลัสโคนิเดียมี 5 เซลล์ เซลล์ส่วนหัว และท้ายมีลักษณะแหลมเรียวใสไม่มีสี (hyaline) เซลล์ตรงส่วนกลางมีสีเข้ม ส่วนท้ายของโคนิเดียมีรยางค์ 2 เส้น หรือมากกว่านั้น และเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. มีลักษณะอาการของโรค คือ เปลือกผลเป็นสีน้ำตาลคล้ำเหมือนเปียกน้ำ จะมีการขยายลามออกไปอย่างรวดเร็ว ถ้ามีความชื้นเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวเทาขึ้นปกคลุมบริเวณแผลที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา ลักษณะภายในผลเนื้อลำไยจะยุบตัว มีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อเละ มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี (colony) มีเส้นใยค่อนข้างฟูสีเทาอ่อนถึงดำ เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body) แบบพิคนิเดีย (pycnidia) ผนังหนา สีดำ แต่ละพิคนิเดียอาจมีช่องเดียวหรือหลายช่องมีปากเปิด (ostiole) โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) เกิดเดี่ยว ๆ รูปทรงกระบอก (oblong) ไม่มีสี (hyaline) ผนังเรียบไม่มีผนังกั้นโคนิเดีย (conidia) มีเซลล์เดียว ใสไม่มีสี เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลดำมี 2 เซลล์รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลมยาว (ellipoid) ส่วนฐานปลายตัด (กรมวิชาการเกษตร, 2557)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบความสามารถนั้น สามารถคัดแยกได้จากดินบริเวณสวนลำไย การควบคุมโรคด้วยวิธีทางชีวภาพจึงมีการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน นับว่าเป็นขั้นตอนสำคัญของความสำเร็จในการนำไปใช้ควบคุมโรคด้วยชีววิธี ซึ่งการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จะคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการทำลายเชื้อโรคพืชได้ นอกจากนี้ยังต้องศึกษาคุณสมบัติอย่างอื่นประกอบด้วย เช่น ความสามารถของการอยู่รอดในธรรมชาติ ความสามารถแข่งขันกับสิ่งมีชีวิตอื่น (นิพนธ์ ทวีชัย, 2553) ดังนั้นจึงให้ความสำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งในสภาพธรรมชาติแต่ละท้องถิ่นที่มีการทำเกษตรกรรมนั้น

จะมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นมากมายหลายชนิด อาศัยอยู่บนดิน หรือรากพืช ในกลุ่มจุลินทรีย์นี้มักจะมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ปะปนอยู่ เพื่อทำหน้าที่ในการเข้าทำลายทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2545) ต่อมาได้มีการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่น *B. subtilis* TU-Orga1 ในการจัดการโรคพืช พบว่า นอกจากการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชและเพิ่มผลผลิตได้ ยังมีความสามารถในการควบคุมโรคได้ดี และมีประสิทธิภาพ (พันศักดิ์ จิตสว่าง, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และและดุสิต อธินุวัฒน์, 2558) และจากการศึกษา พบว่า เชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชส่วนใหญ่นั้นมาจากการแยกจากดิน ส่วนใหญ่มักจะพบเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. (J. Q. Chaves, E. S. Pires และA. M. Vivoni, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ บัวสาย เพชรสุริยวงศ์ และคณะ และสุดารัตน์ แก้วน้ำอ่าง และคณะ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเบื้องต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ (บัวสาย เพชรสุริยวงศ์, นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์, 2555) (สุดารัตน์ แก้วน้ำอ่าง, อังสนา อัครพิศาล และอรอุมา เรืองวงษ์, 2561)

ในการวิจัยนี้ทำการการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ด้วยวิธี Dual culture plate technique (A. M. Skidmore และC. H. Dickinson 1976) สังเกตจากรัศมีของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp.ที่เกิดขึ้น หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (Percent Inhibition of Radial Growth; PIGR) โดยทำการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจากค่า PIGR จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไอโซเลท S050 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. อยู่ที่ 72.67 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท S067 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. อยู่ที่ 70.37 เปอร์เซ็นต์ และจากการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้ง พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ และงานวิจัยของ Wasana Naiumsawang ทำการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* ด้วยวิธี Dual culture technique พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 56.67 เปอร์เซ็นต์ (Wasana Naiumsawang., 2019)

จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผลเน่าในลำไย นำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการศึกษาลักษณะทาง

สัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท S050 และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวก ย้อมแกรมติดสีม่วง มีรูปร่างท่อนสั้น มีการจัดเรียงตัวกระจัดกระจาย มีการสร้างเอนโดสปอร์ขึ้นภายในเซลล์ สปอร์ช่วยให้แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นาน ในสภาพแห้งแล้ง ช่วยให้แบคทีเรียทนความร้อนได้สูง และยังช่วยให้แบคทีเรียแพร่กระจายไปกับ ดิน น้ำ และอากาศได้ดีขึ้นเมื่อสภาวะที่เหมาะสม (ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธ, 2557) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (J. G. Holt และคณะ, 1994) ซึ่งมีคุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. จากนั้นทดสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular Biology) ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) ในรูปแบบของแผนภูมิต้นไม้ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain Y-10 (Genbank: MW047293.1) โดยมีความเหมือนที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลท S067 มีความใกล้ชิดกับแบบทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* strain 21P (Genbank: KM877236.1) ซึ่งมีความเหมือน 99% ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่สูง สามารถบ่งชี้ได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล มีตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันสูง (ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์, 2557)

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ภายในห้องปฏิบัติการนั้น พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท เกิดกลไกยับยั้งการเจริญของเชื้อรา อาจเกิดจากการผลิตปฏิชีวนะสาร ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชนั้น สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด มีการรายงานว่า *Bacillis subtilis* สามารถผลิตปฏิชีวนะสารได้ถึง 65-70 ชนิด โดยสารที่ผลิตขึ้นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ รวมทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β-1, 3 glucanase ได้ (P. Marten, K. Smallaและ G. Berg, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Z. Caixia, Z. Xinxiongและ S. Shihua, 2014) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillis subtilis* สามารถผลิตสาร glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และโปรตีน kinase เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และ *Bacillis amyloliquefaciens* KPS46 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ทางการค้าที่มีความสามารถในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจได้หลายชนิด (Buensanteai N., Yuen G Y. และS. Prathuangwong, 2008) ซึ่ง IAA เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น signal molecule จะส่งสัญญาณตัวกลางให้เกิดความต้านทานทั้ง

ระบบ systemic acequired resistance (SAR) และ induced systemic resistance (ISR) ทำให้พืชมีความแข็งแรงสามารถเจริญเติบโต และรอดพ้นการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Van Loon, L. C. และE. A. Van Strien, 1999) ส่งผลทำให้พืชชนิดนั้นมีความแข็งแรง และสามารถเจริญเติบโตรอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ บุญญวดี จิระวุฒิ และคณะ ได้ศึกษาการควบคุมโรคโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคจากเชื้อเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. ได้ถึง 57.82 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ยังนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทำการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบบผง พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าจากเชื้อเชื้อรา *Lasiodiaplodia* sp. ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรง (บุญญวดี จิระวุฒิ, อมรา ชินภูติ และรัตตา สุทธยาคม, 2560) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Chen Dและคณะ, 2014) กล่าวว่าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* s20 สามารถควบคุมการเจริญเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และ *Fusarium oxysporum* ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารยับยั้ง และใช้เป็นเชื้อควบคุมเชื้อก่อโรคในพืชหลายชนิด โดยสารยับยั้งเชื้อราที่เชื้อกลุ่ม *Bacillus* ผลิตได้ พบว่ามีหลายชนิด เช่น β-1,3-glucanase, cellulose, protease และ chitinase เป็นต้น โดยมีกลไกการยับยั้งของสารซึ่งเกิดจากการย่อยสลาย β-1,3-glucan และ chitin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (L.B. Li และคณะ, 2008) และยังสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม glucanase มีบทบาทในการป้องกันกำจัดโรคพืช สามารถย่อย glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซล์ของเชื้อรา และยังมีสารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการสร้างเซลล์เมมเบรน เปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ (สายใจ อ่อนแก้ว, 2542) สามารถนำไปพัฒนาเพิ่มเติมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมเชื้อราก่อโรค ลดการใช้สารเคมีได้หรือเพิ่มคุณภาพของผลผลิตลำไยต่อไป

อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคผลเน่าในลำไยภายในแปลงเกษตรกรนั้น พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 40.63 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S067 มีเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคเพียง 45.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเก็บรักษาผลของลำไยเป็นระยะเวลา 15 วัน ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคบนผลลำไยได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคนั้นมีแนวทางความเป็นไปได้ในการควบคุมโรค จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถสร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช และยังเป็นแบคทีเรียหนึ่งที่มีศักยภาพใน

การควบคุมโรคพืช โดยชีววิธีที่มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันไป (กัลทิมา พิชัย, 2557) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และคณะ ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพภาพในการควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อรา พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ และผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม และยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวได้ (ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และคณะ, 2559) นอกจากนี้การนำความหลากหลายทางชีวภาพมาปรับใช้ในระบบการเกษตรทดแทนสารเคมีทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่าง ๆ กลับคืนสู่ระบบนิเวศเกษตรอีกครั้ง ส่งผลให้ระบบนิเวศเริ่มเข้าสู่ความสมดุล จึงไม่มีความจำเป็นในการใช้สารเคมีป้องกันศัตรูพืช (ประทุมพร ปลอดภัย, พงศธร ปรโลกานนท์ และดุสิต อธินุวัฒน์, 2558) แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้นั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์กับพืชได้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อลดการใช้สารเคมีและต้นทุนการผลิตอย่างยั่งยืน

การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เปลือกผลลำไยหลังการพ่นเชื้อปฏิปักษ์ และการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์บนผลลำไย เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท S050 และไอโซเลท S067 ที่ทำการฉีดพ่นลงบนผลลำไยภายในแปลงปลูกมีความสามารถในการมีชีวิตรอด ได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าลำไย และเมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไย และความสามารถในการเข้าอาศัยในพืช พบว่า ผลลำไยที่พ่นเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลทมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยน้อยกว่าชุดควบคุม และสามารถเข้าอาศัยภายในผลลำไยได้ (ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล, 2556) แสดงให้เห็นว่าการควบคุมโรคพืชโดยใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างประสบความสำเร็จนั้นมีปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถคงความมีชีวิต และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตลอดจนความสามารถในการครอบครอง และการมีชีวิตรอดบนพืชอาศัย สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และควบคุมโรคพืชของเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (กฤติเดช อนันต และดุสิต อธินุวัฒน, 2559)

ข้อเสนอแนะ

การจัดการโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพเป็นการควบคุมโรคโดยวิธีธรรมชาติ โดยปกติในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะมีการส่งเสริมซึ่งกันและกัน หรือมีการแข่งขัน ต่อสู้กัน เพื่อการเจริญเติบโต และการดำรงชีพ ดังนั้น การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ จึงเป็นการนำเอาสิ่งมีชีวิต หรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมายับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อโรคพืชไม่ให้ทำอันตรายต่อพืช ซึ่งในปัจจุบันนี้มีเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม หรือยับยั้งโรคพืชได้ เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อไวรัสที่สามารถควบคุม และยับยั้งเชื้อโรคพืชได้ดี หากมีการนำมาใช้โดยใส่ลงในดิน พ่นบนใบหรือฉีดเข้าไปในต้นพืช ปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ออกจำหน่ายหรือแจกจ่ายให้เกษตรกรนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณ เพื่อนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีกันอย่างกว้างขวาง และเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่จะนำมาใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพมีความสำคัญมากยิ่งขึ้น เพราะการผลิตสินค้าทางการเกษตรเพื่อการจำหน่าย ทั้งในประเทศ หรือต่างประเทศ จะต้องมีการกำหนดมาตรฐานของสินค้าด้านคุณภาพและความปลอดภัยไว้ ซึ่งอยู่ภายใต้ข้อกำหนดของสนธิสัญญาขององค์กรการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ซึ่งมีการกำหนดมาตรฐานของสินค้า ด้านคุณภาพ และความปลอดภัยไว้สูง ทำให้ผู้ผลิตสินค้าเกษตรเพื่อการจำหน่ายต้องให้ความสนใจในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตด้วยวิธีที่ปลอดภัย และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการผลิตสินค้าทางการเกษตร ที่มีความต้องการลดการใช้สารเคมีหรือไม่ใช้สารเคมีสังเคราะห์ใด ๆ เลยในพืชผัก และผลไม้หลากหลายชนิด ได้แก่ การทำเกษตรอินทรีย์ (organic farming) ดังนั้นการจัดการโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรผู้ผลิตนอกจากจะสามารถนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีแล้วยังทำให้ผลผลิตสินค้าทางการเกษตรมีคุณภาพ และปลอดภัยมากยิ่งขึ้น สามารถส่งออกไปวางจำหน่ายแข่งขันในตลาดโลกได้ และยังได้ราคาที่สูงกว่าสินค้าที่ผลิตโดยวิธีการปกติ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้หลากหลายชนิด ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ต่อมาได้มีการศึกษาและปรับปรุงเชื้อปฏิปักษ์ให้มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อโรคได้ดี และมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่วนใหญ่จะเน้นการปรับปรุงในด้านความอยู่รอดของเชื้อในธรรมชาติได้กว้างขวางทุก ๆ สภาพพื้นที่ หรืออยู่บนพืชอาศัยหลายชนิดในการควบคุมโรค โดยสามารถนำไปพัฒนาผลิตเผยแพร่ หรือผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ได้ โดยในอนาคตการนำเอาวิธีการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพมาใช้ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการที่เหนือกว่าการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามความสำเร็จที่จะได้รับในอนาคตนั้น ขึ้นอยู่กับ

การเผยแพร่ความรู้จะต้องเร่งศึกษาค้นคว้ากันอย่างจริงจัง และมากยิ่งขึ้น เพื่อให้สามารถนำมาแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมทั้งการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ เป็นการทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากในพื้นที่วิสาหกิจชุมชนแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา ที่จะนำแบคทีเรียปฏิปักษ์กลับไปประยุกต์ใช้ และเป็นการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อปฏิปักษ์แตกต่างกัน เพื่อที่จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าว และนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบภายในแปลงปลูกลำไยของเกษตรกร จะทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปประยุกต์ใช้ ในการควบคุมโรคผลเน่าในลำไยมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ และการควบคุมโรคในระดับแปลงปลูก เชื้อที่คัดเลือกได้ยังไม่สามารถควบคุมโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังอาจต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค เช่น การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อราของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดังรายงานของวาสนา เนียมแสวง มีการรายงานว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 (วาสนา เนียมแสวง, 2562) และรายงานวิจัยของ Vijayakshimi, et al.ที่ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* spp. ในการผลิตสารยับยั้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งอยู่ในค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0-8.0 ที่ช่วงอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส (K. Vijayakshmi, A. Premalatha และR.G. Suseela, 2011) ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เชื้อที่คัดเลือกได้จากการทดลองนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะต่าง ๆ เพิ่มเติม เช่น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเชื้อ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการฉีดพ่น หรือการศึกษาสารรักษาสภาพเชื้อที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เพื่อหาแนวทางการประยุกต์ใช้ที่ดีต่อไป

บรรณานุกรม

A. M. Skidmore และC. H. Dickinson (1976). Colony interactions and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, 66(1), 57-64.

Buensanteai N., Yuen G Y. และPrathuangwong S. (2008). The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces Auxin, Surfactin and Extracellular Proteins for Enhanced Growth of Soybean Plant. **Journal of Agricultural Science**, 41(3-4), 101-116.

Caixia Z., Xinxiong Z. และShihua S. (2014). Proteome analysis for antifungal effects of *Bacillus subtilis* KB-1122 on Magnaporthe grisea P131. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(6), 1763-1774.

Chaves J. Q., Pires E. S.และVivoni A. M. (2011). Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, 147(1), 12-16.

Chen D, Liu X, Li C, Tian W, Shen Q และShen B. (2014). Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacteria wilt. **Journal of Environmental Management**, 137, 120-127.

Eduardo N. Esteban , Mirentxu Indart, Silvia Cerone, G. de Yaniz, Ana G. Inza, Herminia Landi และคณะ. (2012). Production and Biochemestry-Molecular Analysis of Microbial Community Fermenting Whey as a Potential Probiotic for Use Animals. **Journal of Veterinary Medicine**, 2, 104-112.

Gamaliel A., Katan J.และConen E. (1989). Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. **Phytoparasitica**, 17, 101-106.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. และWilliams S. T. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology** (พิมพ์ครั้งที่ 9). New York: Williams and Wikins.

Janisiewicz W. J. (1988). **Biological control of diseases of fruits** (In K.G. Mukergi and K.L. Grag. (Eds) ed. พิมพ์ครั้งที่ 2).

K. F. Baker และR. J. Cook. (1974). **Biological control of plant pathogens**. In Company, W. F. a. (Ed.).

Li L.B., Zhang C.Y., Li S.N., Li J., Guo X.J. และZhu B.C. (2008). Isolation and identification of the antagonistic bacterial strain 8-59 against *Colletoichum gloeosporioides*. **Journal of Agriculture University of Hebei**, 31(3), 64–68.

Marten P., Smalla K. และBerg G. (2000). Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. **Jornal of Applied Microbiology**, 89(3), 463-471.

Sakunyarak K.และSatithorn W. (2014). Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to *Colletotrichum musae* on banana. **Journal of Agricultural Technology**, 10(2), 383-390.

Van Loon, L. C. และVan Strien E. A. (1999). The families of pathogenesis-relate proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type protein. **Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55(213), 85-97.

Vijayakshmi K., Premalatha A.และSuseela R.G. (2011). Antimicrobial protein production by *Bacillus amyloliquefaciens* MBL27: Optimization of culture conditions using Taguchi's experimental design. **Indian Journal of Science and Technology**, 4(8), 931-937.

Wasana Naiumsawang. (2019). Isolation and Screening of Bacterial Antagonistic for Controlling *Aspergillus flavus.* **Wichcha Journal**, 38(1), 28-41.

กรมวิชาการเกษตร. (2557). โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (ลำไย). Retrieved from สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร:

กรมวิชาการเกษตร. (2558). การผลิตลำไยนอกฤดู (ประวัติความสำคัญ). Retrieved 27 กรกฎาคม 2562 http://www.doa.go.th/share/docs/longgan/historylonggan.pdf

กรมวิชาการเกษตร. (2558). การผลิตลำไยนอกฤดู (ลักษณะทางพฤษศาสตร์ และพันธุ์). Retrieved 27 กรกฎาคม 2562 http://www.doa.go.th/share/docs/longgan/botanycultivarlonggan.pdf.

กฤติเดช อนันต และดุสิต อธินุวัฒน. (2559). การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TUOrga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลย, 24(5).

กัลทิมา พิชัย. (2557). การเพาะเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* BCC 6327 เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ. Retrieved 26 มกราคม 2564 http://www.research.cmru.ac.th/2014/ris/resout/arc/048-55-SCI-MUA.pdf.

เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ขัดสงคราม. (2555). การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร, 28(3), 285-294.

จริยา วิสิทธิ์พานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. (2545). โรค และแมลงศัตรู ลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง. Retrieved from สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.):

จิระเดช แจ่มสว่าง. (2545). การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

จิระเดช แจ่มสว่าง, วรรณวิไล อินทน และพราวมาส เจริญรักษ์. (2553). ผลของการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวและคุณภาพข้าว. วารสารงานวิจัยสู่ชาวสวนเคหะการเกษตร, 35(1), 199-200.

จิระวุฒิ บุญญวดี. (2559). การควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อราด้วยจุลินทรีย. โครงการวิจัยการจัดการโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยไม่ใช้สารเคมี, 10-26.

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ , เนตรา สมบูรณ์แก้ว, ศุภรา อัคคะสาระกุล, สุพี วนศิรากุล, ชุติมา วิธูรจิตต์, อัจฉราพร ศรีจุดานุ และคณะ. (2559). การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว. Retrieved from กรมวิชาการเกษตร รายงานโครงการวิจัย คลังผลงานวิจัย

ชัยพร ขัดสงคราม และเกวลิน คุณาศักดากุล. (2556). ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซิสต์โดไฟต์จากพืชวงศ์ลำไยในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร, 29(3), 239-248

ชาตรี สิทธิกุล , อังสนา อัครพิศาล, พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และอรุณ โสตถิกุล. (2547). โครงการการจัดการโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไยนอกฤดูในเขตภาคเหนือ. Retrieved from รายงานการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย: กรุงเทพฯ

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธ. (2557). เมื่อพูดถึงสปอร์นึกถึงอะไร. Retrieved 20 กุมภาพันธ์2564 http://biology.ipst.ac.th/?p=828

นิพนธ์ ทวีชัย. (2553). โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว.

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์, นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. (2555). การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา. ใน **Paper presented at the** การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 50 (หน้า 124-131). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุญญวดี จิระวุฒิ, อมรา ชินภูติ และรัตตา สุทธยาคม. (2560). โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุมโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์. วารสารกรมวิชาการเกษตร, 35(3), 229-242.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ , สุรีย์พร บัวอาจ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภูไพบูลย์. (2556). การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica.* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 (กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช), 855-898.

ปฏิกรณ์ อินโองการ และสันพา ศิริลักษณ์. (2560). การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Curvularia lunata* เชื้อราสาเหตุโรคกล้าเน่าของข้าว. นเรศวรวิจัยครั้งที่ 13, 103-111.

ประทุมพร ปลอดภัย, พงศธร ปรโลกานนท์ และดุสิต อธินุวัฒน์. (2558). ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมด้วงหมักผัก (*Phyllotreta sinuate*) และหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ในระบบการผลิตคะน้า. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 23(6).

ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์ และนิรมล ศากยวงศ์. (2557). การจำแนกราด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์และความสามารถในการบำบัดสีรีแอคทีฟ RR141. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22(5), 683-694.

ปิยะวรรณ ขวัญมงคล. (2551). ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ***Lasiodiplodia* sp.** ในลำไยพันธุ์ดอหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

พันศักดิ์ จิตสว่าง, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และและดุสิต อธินุวัฒน์. (2558). เทคโนโลยีการจัดการโรคพืชในระบบการผลิตข้าวอินทรีย์. วารสาร **Science and Technology**, 4(3), 272-285.

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช. (2559). หลักวิชาโรคพืช. from สารมวลชน

เยาวพา สุวัตถิ. (2553). การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช. Retrieved 27 กรกฎาคม 2562 http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=2847.

เรวดี เคลือบคนโท. (2559). การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคใบไหม้ในข้าวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

ลักษณ์ วงศ์หิริญภิญโญ , ลาลี่ ชินสกิตย์, พัฒน์พงศ์ ภัทรโกศล และชูชาติ วัฒนวรรณ. (2545). การศึกษาสาเหตุเบื้องต้นของโรคลำไยเปลือกแตกและเน่า. วารสารโรคพืช ปีที่ 16, 1(2), 71-73.

วาสนา เนียมแสวง. (2562). การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus.* วารสารวิชชา, 38(1), 28-41.

ศักดิ์มนตรี นาชัยเวียง. (2537). เชื้อราในช่อดอกและขั้วผลของลำไยพันธุ์ดอ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2559, 24-25 กุมภาพันธ์ 2559) การควบคุมโรคพืชและการเก็บเมล็ดพันธุ์พืช เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และลดต้นทุนการผลิต. ใน การอบรมเชิงปฏิบัติการ, วัดศรีบุญเรือง, นครพนม.

สายใจ อ่อนแก้ว. (2542). สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. (2556). ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. Retrieved 27 กรกฎาคม 2562 http://www.oae.go.th/.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและทรัพยากร. (2562). สถิติการส่งออกลำไยสดตั้งแต่ปี 2560-2561. Retrieved 28 กรกฎาคม 2562 http://impexp.oae.go.th/service/export.php?SYEAR=2560&EYEAR=2561&PRODUCTGROUP=5252&PRODUCTID=4990&wfsearch=&WFSEARCH=Y.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและทรัพยากร. (2563). ผลพยากรณ์การผลิตไม้ผลที่สำคัญปี 2562 (ลำไย). Retrieved 28 มิถุนายน 2562, from คณะกรรมการพัฒนาคุณภาพข้อมูลด้านการเกษตร

สุดารัตน์ แก้วน้ำอ่าง, อังสนา อัครพิศาล และอรอุมา เรืองวงษ์. (2561). การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากแบคทีเรียของเมลอน. วารสารเกษตร, 34(2), 193-204.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาตร 1 ลิตร

Potato dextrose agar	39.00 กรัม
Agar	5.132 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำ Distilled water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น จึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อ

2. Potato Dextrose Agar (NA) ปริมาตร 1 ลิตร

Beef extract	3.00 กรัม
Peptone	5.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำ Distilled water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.8–7.0 ต้มจนเดือด ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น จึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อ

3. Potato Dextrose Agar (NB) ปริมาตร 1 ลิตร

Beef extract	3.00 กรัม
Peptone	5.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำ Distilled water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.8–7.0 ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. **Luria–Bertani broth (LB broth) ปริมาตร 1 ลิตร**

Bactopeptone	10.00 กรัม
Yeast extract	5.00 กรัม
NaCl	5.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำ Distilled water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.8–7.0 นำใส่ขวด media bottle ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานอาหารปลอดเชื้อ

อาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. **การทดสอบ Strict anaerobes**

1.1. วิธีการทดสอบ

เลี้ยงตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน ด้วย anaerobes jar และใส่ GasPak ลงไป 1 ซอง (ดังภาพ 30) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง

1.2. การแปลผล

อ่านผลการทดสอบโดยดูว่า หากเชื้อแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนได้ ให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนให้ผลเป็นลบ (–)

2. **การทดสอบ Starch Hydrolysis**

2.1. อาหารที่ใช้ทดสอบ

Yeast extract	3.00 กรัม
Peptone	5.00 กรัม
Potato starch	10.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

2.2. วิธีการทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร starch agar ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยด iodine solution ลงไป 2–3 หยด

2.3.การแปลผล

ไอโอดีนจะทำปฏิกิริยากับแป้งในอาหาร ทำให้บริเวณที่มีแป้งอยู่กลายเป็นสีน้ำเงินอมม่วง หมายความว่า ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงว่า ผลการทดสอบเป็นบวก (+) แบคทีเรียสามารถใช้แป้งได้ แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่า ผลการทดสอบเป็นลบ (-)

3. การทดสอบ Voges-Proskauer (VP)

3.1. อาหารที่ใช้ทดสอบ

MR-VP medium	17.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 กรัม

3.2. การเตรียม 5% α-naphthol solution

α- naphthol	10.00 กรัม
95%Ethanol	100.00 มิลลิลิตร

3.3. การเตรียม 40% KOH

Potassium hydroxide	20.00 กรัม
Distilled water	100.00 มิลลิลิตร

3.4. วิธีการทดสอบ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร MR-VP broth ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม 5% α-naphthol solution 0.6 ml และเติม 40% KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10-15 นาที

3.5. การแปลผล

เมื่อเติม 40% KOH จะทำให้ acetion ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกลางถูก Oxidize เป็น diacetyl ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับ α-naphthol ให้เกิดเป็น complex สีแดงส้มภายใน 5 นาที ให้ผลเป็นบวก (+) หากเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ (-)

4. การทดสอบ citrate Test

4.1. อาหารที่ใช้ทดสอบ

Sodium chloride	5.00 กรัม
Magnesium sulphate	0.20 กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.00 กรัม

Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4)	1.00 กรัม
Sodium citrate	2.00 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
Agar	15.00 กรัม
Distilled water	1,000.00 มิลลิลิตร

4.2. วิธีการทดสอบ

เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยขีดเป็นเส้นตรงยาวบนผิวอาหาร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3. การแปลผล

ตรวจสอบสีของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้ citrate ได้ จะเกิดปฏิกิริยาทำให้อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวก (+) และแบคทีเรียที่ไม่ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนอาหารจะมีสีเขียวดังเดิม ปฏิกิริยาให้ผลเป็นลบ (–)

5. การทดสอบ 6.5% NaCl Growth

5.1. อาหารที่ใช้ทดสอบ

Brain heart infusion agar	26.00 กรัม
Glucose	5.00 กรัม
Sodium chloride	30.00 กรัม
Bromcresol purple (1% ethanol)	1.00 มิลลิลิตร
Proteose peptone	5.00 กรัม
Distilled water	500.00 กรัม
pH 7.0	

5.2. วิธีการทดสอบ

เลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบ บ่มเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.3. การแปลผล

อาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ถึง 6.5% เชื้อที่สามารถทนต่อความเข้มข้นนี้ได้จึงเจริญ และใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะไปเปลี่ยนสี Bromcresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก (+) หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ

ภาคผนวก ข การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบลำไย และดินบริเวณแปลงปลูกลำไย

ตาราง 11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน และใบบริเวณสวนลำไย

ลำดับ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี			ลักษณะขอบโคโลนี		ลักษณะเนื้อผิวโคโลนี		ลักษณะผิวโคโลนี		สีโคโลนี
	ใหญ่ ≥1 มม.	กลาง ≥0.8 มม.	เล็ก ≥0.3 มม.	ขอบหยัก	ขอบเรียบ	ผิวมัน	ผิวด้าน	ผิวขรุขระ	ผิวเรียบ	
S001			✓	✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S002			✓	✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S003	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S004		✓			✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S005		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S006			✓		✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S007			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S008			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S009	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S010	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S011		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S012		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S013			✓		✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S014	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S015			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S016		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S017		✓		✓		✓			✓	สีขาวขุ่น
S018		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S019			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S020	✓			✓		✓			✓	สีขาวขุ่น
S021		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S022			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S023			✓		✓	✓			✓	สีเหลืองใส
S024		✓			✓	✓		✓		สีใส
S025			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S026			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S027			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S028		✓			✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S029		✓			✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S030			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S031	✓			✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S032		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S033	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S034		✓			✓	✓			✓	สีใส
S035		✓			✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S036			✓		✓	✓			✓	สีใส

ลำดับ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี			ลักษณะขอบโคโลนี		ลักษณะเนื้อผิวโคโลนี		ลักษณะผิวโคโลนี		สีโคโลนี
	ใหญ่ ≥1 มม.	กลาง ≥0.8 มม.	เล็ก ≥0.3 มม.	ขอบหยัก	ขอบเรียบ	ผิวมัน	ผิวด้าน	ผิวขรุขระ	ผิวเรียบ	
S037	✓				✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S038			✓	✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S039			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S040			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S041		✓			✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S042		✓			✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S043			✓	✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S044			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S045			✓		✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S046			✓	✓			✓		✓	สีเหลือง
S047			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S048		✓		✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S049			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S050		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S051		✓		✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S052			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S053			✓	✓		✓			✓	สีใส
S054	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S055			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S056		✓			✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S057	✓			✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S058	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S059			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S060	✓				✓	✓		✓		สีขาวขุ่น
S061			✓	✓		✓			✓	สีขาวขุ่น
S062		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S063	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S064			✓	✓		✓			✓	สีใส
S065			✓	✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S066			✓		✓	✓			✓	สีเหลือง
S067	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S068			✓		✓	✓			✓	สีใส
S069		✓			✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S070			✓		✓	✓			✓	สีใส
S071			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S072			✓	✓			✓		✓	สีขาวเหลือง
S073			✓	✓		✓			✓	สีขาวขุ่น
S074			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น

ลำดับ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี			ลักษณะขอบโคโลนี		ลักษณะเนื้อผิวโคโลนี		ลักษณะผิวโคโลนี		สีโคโลนี
	ใหญ่ ≥1 มม.	กลาง ≥0.8 มม.	เล็ก ≥0.3 มม.	ขอบหยัก	ขอบเรียบ	ผิวมัน	ผิวด้าน	ผิวขรุขระ	ผิวเรียบ	
S075			✓	✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S076			✓		✓		✓	✓		สีใส
S077			✓		✓	✓			✓	สีเหลือง
S078			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S079		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S080			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S081	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S082			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S083			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S084			✓		✓	✓			✓	สีใส
S085			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S086		✓			✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S087			✓		✓	✓		✓		สีใส
S088			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S089			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S090			✓		✓	✓			✓	สีใส
S091			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S092			✓		✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S093			✓	✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S094			✓		✓		✓		✓	สีเหลือง
S095			✓		✓	✓			✓	สีครีม
S096	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S097	✓				✓	✓			✓	สีขาวขอบใส
S098	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S099	✓			✓			✓	✓		สีขาวขุ่น
S100			✓		✓	✓			✓	สีเหลือง
S101	✓				✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S102	✓			✓			✓		✓	สีขาวขุ่น
S103		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S104		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S105		✓			✓	✓			✓	สีครีม
S106	✓				✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S107	✓				✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S108			✓		✓	✓			✓	สีใส
S109	✓				✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S110	✓				✓		✓	✓		สีขาวขุ่น
S111		✓		✓		✓			✓	สีขาวขุ่น
S112		✓		✓			✓	✓		สีครีม

ลำดับ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี			ลักษณะขอบโคโลนี		ลักษณะเนื้อผิวโคโลนี		ลักษณะผิวโคโลนี		สีโคโลนี
	ใหญ่ ≥1 มม.	กลาง ≥0.8 มม.	เล็ก ≥0.3 มม.	ขอบหยัก	ขอบเรียบ	ผิวมัน	ผิวด้าน	ผิวขรุขระ	ผิวเรียบ	
S113			✓		✓		✓		✓	สีขาวขุ่น
S114	✓				✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S115		✓			✓	✓			✓	สีครีม
S116			✓		✓	✓			✓	สีขาวเหลือง
S117		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S118		✓			✓	✓			✓	สีขาวขุ่น
S119		✓			✓	✓			✓	สีครีม
S120	✓				✓	✓			✓	สีขาวขุ่น

ภาคผนวก ค สูตรคำนวณ

สูตรคำนวณ

1. **การหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง** โดยแทนค่าที่วัดความยาวรัศมีของเส้นใย

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

เมื่อ R1 คือ รัศมีของเชื้อราที่ไม่ได้เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ (control)

R2 คือ รัศมีของเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับจุลินทรีย์ทดสอบ

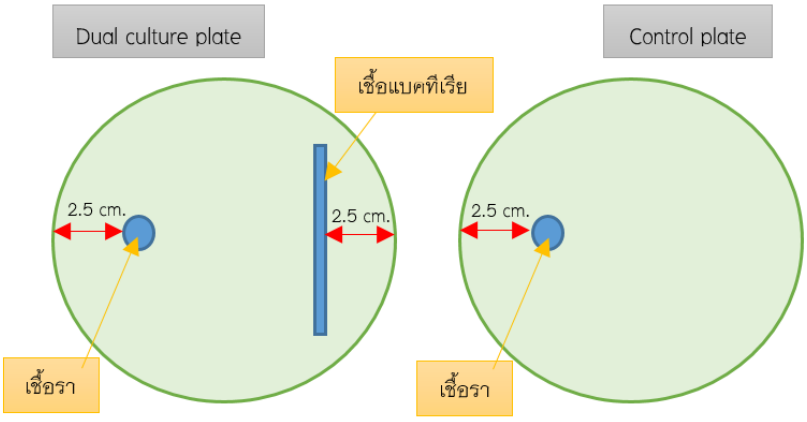
โดยประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจากค่า PIGR ดังนี้

> 80.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก

> 61.00-79.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง

> 51.00-60.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง

< 50.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับ



Dual culture plate technique

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน
วัน เดือน ปี เกิด	11 มิถุนายน 2539
สถานที่เกิด	ปราจีนบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 วท.บ. (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	80 ลาดกระบัง14/1 แยก6 ถนน ลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10520
ผลงานตีพิมพ์	จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน และสุภัค มหัทธนพรรค. (2564). การคัดเลือกและระบุสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา. การประชุมวิชาการระดับชาติ พะเยาวิจัยครั้งที่ 10, (2244-2254)
รางวัลที่ได้รับ	2562 รางวัลนิสิตเกียรติยศ ด้านกิจกรรมเสริมหลักสูตร กิจกรรมบำเพ็ญประโยชน์และรักษาสิ่งแวดล้อม 2561 รางวัลนิสิตเกียรติยศ ด้านกิจกรรมเสริมหลักสูตร กิจกรรมบำเพ็ญประโยชน์และรักษาสิ่งแวดล้อม 2559 นิสิตดีเด่นด้านกิจกรรมเสริมหลักสูตร ประเภทกิจกรรมบำเพ็ญประโยชน์และรักษาสิ่งแวดล้อม