บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการและการแยกเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

จากการศึกษาลักษณะโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน พบว่าโรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของต้นพืช การเข้าทำลายในระยะต้นอ่อนเชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายบริเวณโคนต้น (ภาพ 2 ก) แผลจะมีลักษณะคล้ายโดนน้ำร้อนลวก ทำให้ต้นกล้าล้มพับลง รากเน่าและยอดแห้งตาย ส่วนอาการที่ผล ผลจะช้ำแผลมีสีน้ำตาล และเน่า มีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมทั่วบริเวณ (ภาพ 2 ข)

ภาพ 2 ลักษณะอาการของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

ก. แผลบริเวณโคนต้นมีลักษณะคล้ายโดนน้ำร้อนลวก แผลมีสีน้ำตาล

ข. ผลเน่า และบริเวณแผลมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราปกคลุมทั่วผล

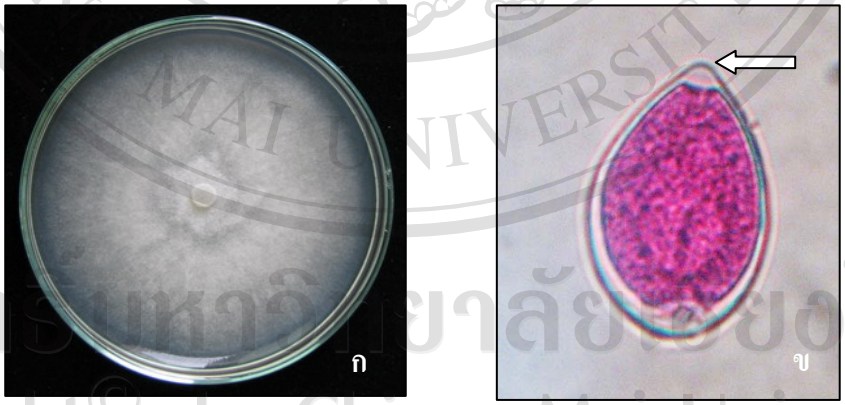
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน

จากการแยกเชื้อสาเหตุของโรคพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มีลักษณะเส้นใยสีขาวคล้ายสำลี เจริญฟูขึ้นเหนือผิวหน้าอาหารจนเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่มีการสร้าง sporangium คล้ายผลมะนาว ตรงปลายมองเห็น papilla ชัดเจน (ภาพ 3) ซึ่งเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้มี 5 ไอโซเลทจากวิธีการแยกเชื้อที่แตกต่างกันดังตาราง 1

ตาราง 1 เชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลทที่แยกจากวิธีการต่างกัน

เชื้อ	วิธีการและตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ
Phytophthora sp. ไอโซเลท 01	hyphal tip culture (โคนต้นที่เกิดโรค)
Phytophthora sp. ไอโซเลท 02	ล่อเชื้อด้วยแครอท (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
Phytophthora sp. ไอโซเลท 03	ล่อเชื้อโดยใช้ใบสัปปะรด (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
Phytophthora sp. ไอโซเลท 04	ล่อเชื้อโดยใช้ใบสัปปะรด (วัสดุปลูกจากตัวอย่างที่เป็นโรค)
Phytophthora sp. ไอโซเลท 05	hyphal tip culture (ผลพริกหวานที่เกิดโรค)



ภาพ 3 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท 01 สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะสีขาว ฟู ละเอียดคล้ายสำลี บนอาหาร PDA อายุ 9 วัน

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

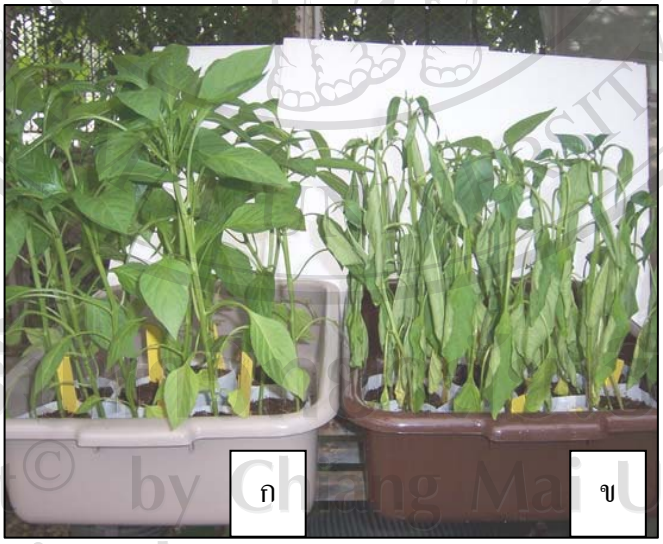
1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลทซึ่งได้แก่ SP01, SP02, SP03, SP04 และ SP05 ที่แยกได้จากพริกหวาน โดยการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc บนใบพริกหวานทั้งด้านทำแผลและไม่ทำแผล หลังการปลูกเชื้อนาน 3 วัน พบว่าเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลท ทำให้ใบด้านที่ทำแผล เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแสดงอาการคล้ายน้ำร้อนลวกลุกลามไปถึงบริเวณไม่ทำแผล และเน่าและทั้งใบในที่สุด (ภาพ 4) ส่วนการปลูกเชื้อบริเวณโคนต้นของเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วย mycelial disc บนโคนต้นที่ทำแผลและไม่ทำแผลนาน 3 วัน พบแผลสีน้ำตาลในบริเวณโคนต้นทั้งในต้นที่ทำแผลและไม่ทำแผล เมื่อปลูกเชื้อนาน 5 วัน พบว่าแผลสีน้ำตาลขยายลุกลามไปรอบๆ ต้นทั้งด้านบนและด้านล่าง ลักษณะแผลฉ่ำน้ำ ใบหลุดร่วงและต้นพริกเริ่มแสดงอาการเหี่ยว (ภาพ 5) หลังการปลูกเชื้อผ่านไป 7 วันต้นพริกแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น ลำต้นนิ่ม เน่าเละ ทั้งโคนที่ทำแผลและไม่ทำแผล เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพ 6)

ภาพ 4 ลักษณะใบพริกหวานแสดงอาการคล้ายน้ำร้อนลวกหลังปลูกเชื้อด้วย mycelial disc ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ระยะเวลา 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 5 ลักษณะอาการที่โคนต้นหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. นาน 7 วัน
ก. โคนต้นมีสีน้ำตาล บริเวณลำต้นที่ทำแผล
ข. โคนต้นมีสีน้ำตาล บริเวณลำต้นที่ไม่ทำแผล



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 6 ลักษณะอาการหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp.นาน 7 วัน
ก. ต้นพริกปกติในชุดควบคุม
ข. ต้นพริกแสดงอาการใบเหี่ยวหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp.

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวานทั้ง 5 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถเจริญค่อนข้างดีถึงปานกลาง โคโลนีของเชื้อมีสีขาว ค่อนข้างฟู ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA มี 3 แบบได้แก่ slightly stellate pattern, rosette pattern และ slightly petallate pattern เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 10 วัน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยของเชื้อราใสไม่มีสี ไม่มี septum กั้น เส้นใยมีลักษณะเรียบ มีการสร้าง sporangium ได้หลายแบบคือ lemon shape, obpyriform, ellipdoid และ ovoid - pyriform มองเห็น papilla ชัดเจน มีขนาดเฉลี่ย (เฉลี่ยจาก 50 sporangium) ความกว้างประมาณ 34 - 42 µm และความยาว 27 - 33 µm มีค่าอัตราส่วน L/B ratio เท่ากับ 1.17 to 1.38 ภายใน sporangium มี zoospores เป็นจำนวนมาก (ตาราง 2; ภาพ 7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์จำนวน 5 ไอโซเลท

Isolate	Colony					Sporangia (9 days)			
	Radial of growth (mm)*				Pattern	Size (μm)**	L/B ratio	Shape	Papilla
	3 days	5 days	7 days	9 days					
SP01	21.0	30.0	39.6	45.01[1]	slightly stellate	32.10 × 42.35	1.32	lemon	+
SP02	21.2	25.8	34.5	45.01[1]	rosette	29.45 × 34.40	1.17	obpyriform	+
SP03	21.8	32.0	39.9	45.01[1]	slightly stellate	27.95 × 38.65	1.38	ovoid-pyriform	+
SP04	22.2	31.1	39.8	45.01[1]	slightly petallate	33.28 × 42.05	1.26	obpyriform	+
SP05	23.3	32.8	41.9	45.01[1]	slightly stellate	27.10 × 37.03	1.37	ellipsoid	+

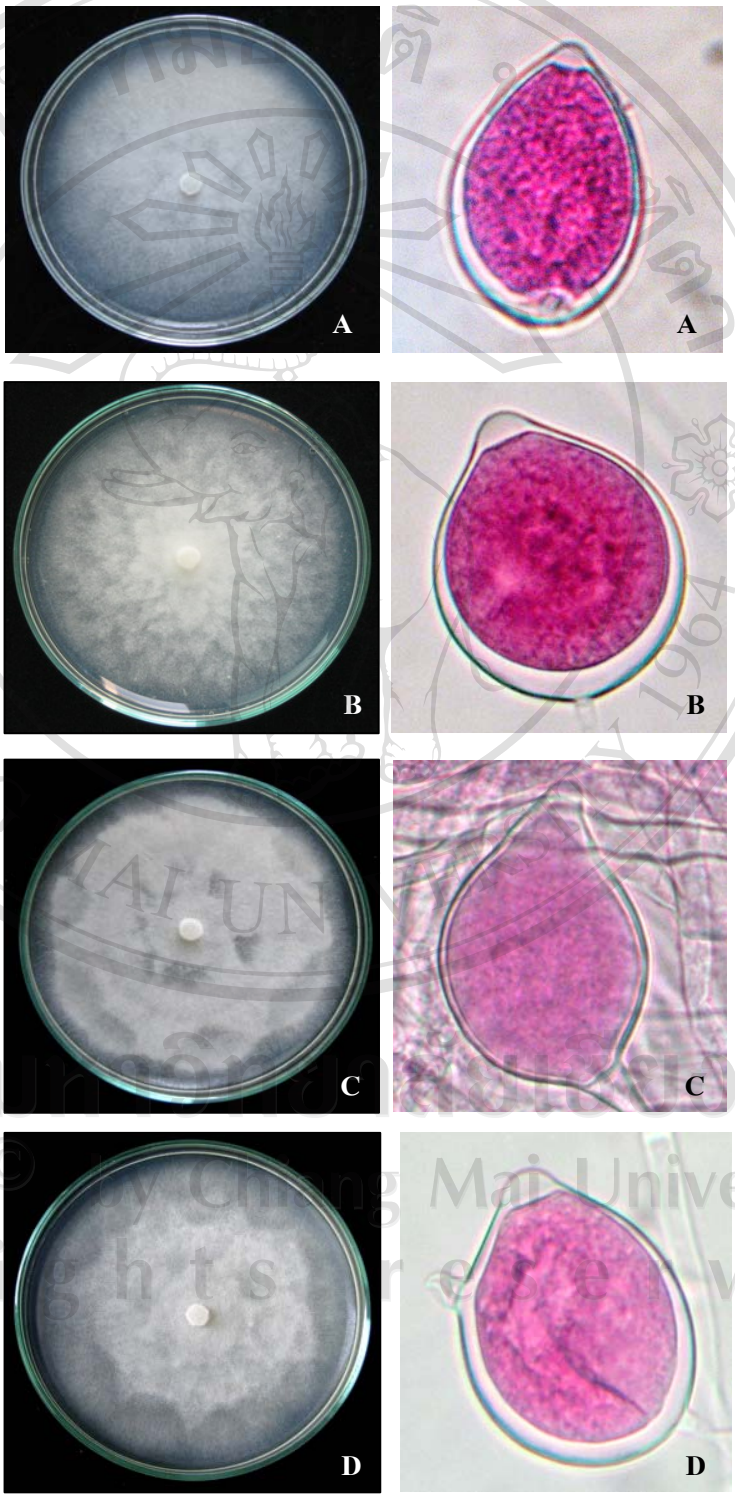
หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

** ค่าเฉลี่ยจาก 50 sporangium

[1] เชื้อทดสอบมีการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

colony sporangium



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

colony sporangium

ภาพ 7 ลักษณะโคโลนี (บนอาหาร PDA) และ sporangium ของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ ที่อายุ 9 วัน

A = ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของไอโซเลท SP01

B = ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของไอโซเลท SP02

C = ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของไอโซเลท SP03

D = ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของไอโซเลท SP04

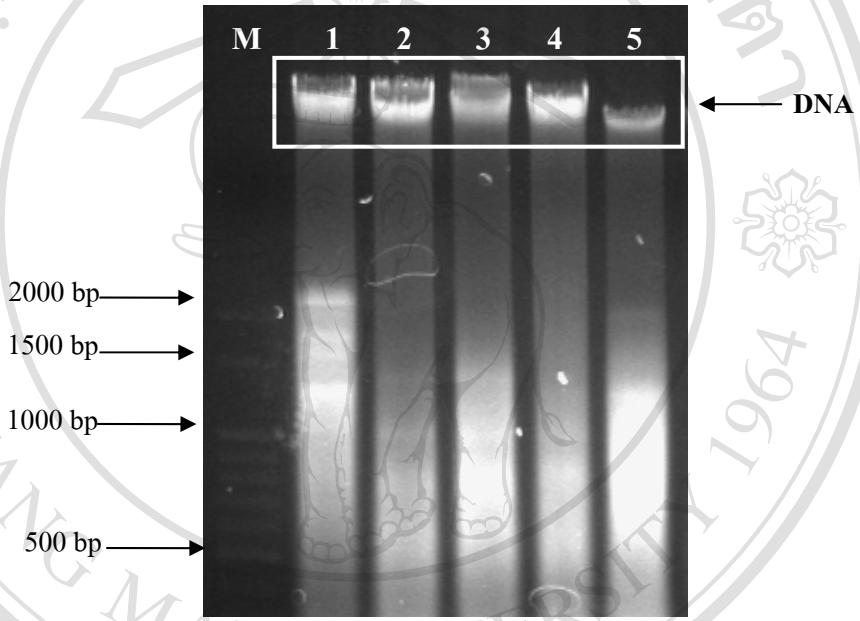
E = ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของไอโซเลท SP05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* sp.

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวานที่เป็นโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ SP01, SP02, SP03, SP04 และ SP05 เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและเช็คปริมาณโดยวิธี agarose gel electrophoresis (ภาพ 8) จากภาพแถบดีเอ็นเอที่ได้ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีปริมาณมากและมีคุณภาพดี



ภาพ 8 Gel electrophoresis บน 1 % agarose gel ของ total DNA จากเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลทสาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในพริกหวาน

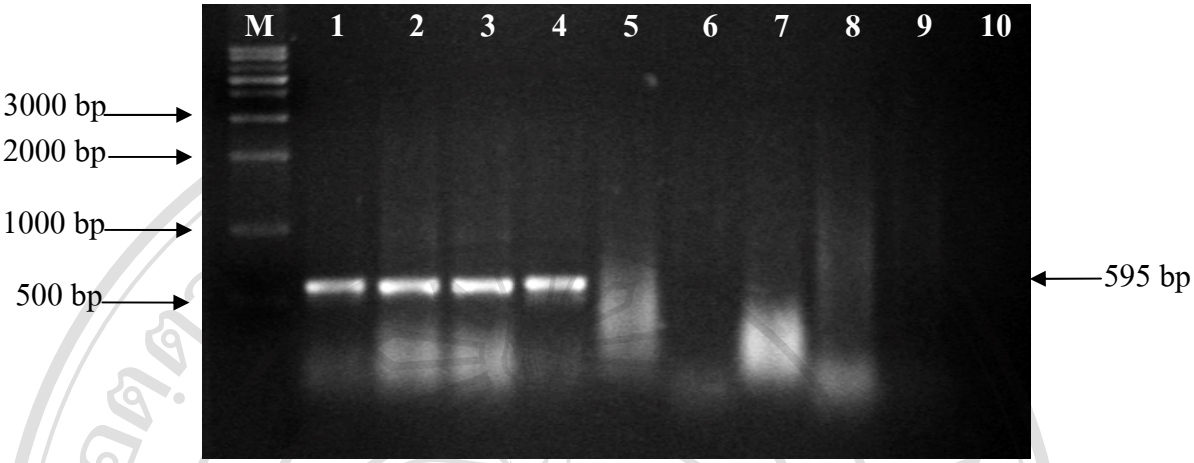
แถวที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP01
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP02
แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP03
แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP04
แถวที่ 5 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นต้นและสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชชนิดอื่นที่แสดงอาการของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ ได้แก่ กล้วยไม้ 1 ไอโซเลท ทุเรียน 1 ไอโซเลทและส้ม 2 ไอโซเลท เพื่อใช้เปรียบเทียบกับเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวานทั้ง 5 ไอโซเลท เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้งหมดด้วย CAPFW (forward primer) (5' TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC 3') และ CAPRV2 (reverse primer) (5' TACGGTTCACCAGCCCATCA 3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 595 bp ที่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora capsici* จากตัวอย่างเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP01 ไอโซเลท SP02 ไอโซเลท SP03และไอโซเลท SP04 ซึ่งเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถแยกได้จากส่วนโคนต้นและวัสดุปลูกของพริกหวานที่แสดงอาการของโรคแต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในไอโซเลท SP05 ที่แยกได้จากส่วนผลพริกหวานที่แสดงอาการของโรคเปรียบเทียบกับเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 Gel electrophoresis บน 1 % agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primers CAPFW/ CAPRV2 จากเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์

แถวที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1000 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP01
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP02
แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP03
แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP04
แถวที่ 5 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท SP05
แถวที่ 6 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากกล้วยไม้
แถวที่ 7 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากทุเรียน
แถวที่ 8 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากส้ม
แถวที่ 9 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากส้ม
แถวที่ 10 = น้ำเปล่า (negative control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนต่างๆของพริกหวาน

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณต่างๆ ได้แก่ ผิวใบ ในใบ ผิวรากและส่วนต่างๆของพริกหวานสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งสิ้น 177 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบจำนวนที่แยกได้ พบว่าส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนใบ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมด 87 ไอโซเลท ส่วนของลำต้น 50 ไอโซเลท ส่วนราก 18 ไอโซเลท และส่วนวัสดุปลูก 22 ไอโซเลท ผลจากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดจำนวน 177 ไอโซเลท มาทำการทดสอบในขั้นต้น พบ 2 ไอโซเลทที่แยกได้จากใบพริกหวาน 1 ไอโซเลทจากส่วนของลำต้น 2 ไอโซเลทจากส่วนรากและ 1 ไอโซเลทจากวัสดุปลูกที่มีประสิทธิภาพดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P. capsici* ไอโซเลท SP01 ดังตาราง 3 จึงนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลทอื่นต่อไป

ตาราง 3 จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* ไอโซเลท SP01

ส่วนของพริกหวาน	จำนวนที่แยกได้ (ไอโซเลท)	จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพจากการทดสอบขั้นต้น	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P.capsici* ไอโซเลท SP01
ใบ	87	2	53.78
			44.89
ลำต้น	50	1	66.67
ราก	18	2	61.33
			46.67
วัสดุปลูก	22	1	42.67

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp.

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 6 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *P. capsici* ไอโซเลท SP01 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลทอื่นๆโดยวิธี dual culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท ได้แก่ SPSB 27 และ SPRB 20 ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 62.63 - 65.28 ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 56.07 - 60.84 (ตาราง 4, ภาพ 10)

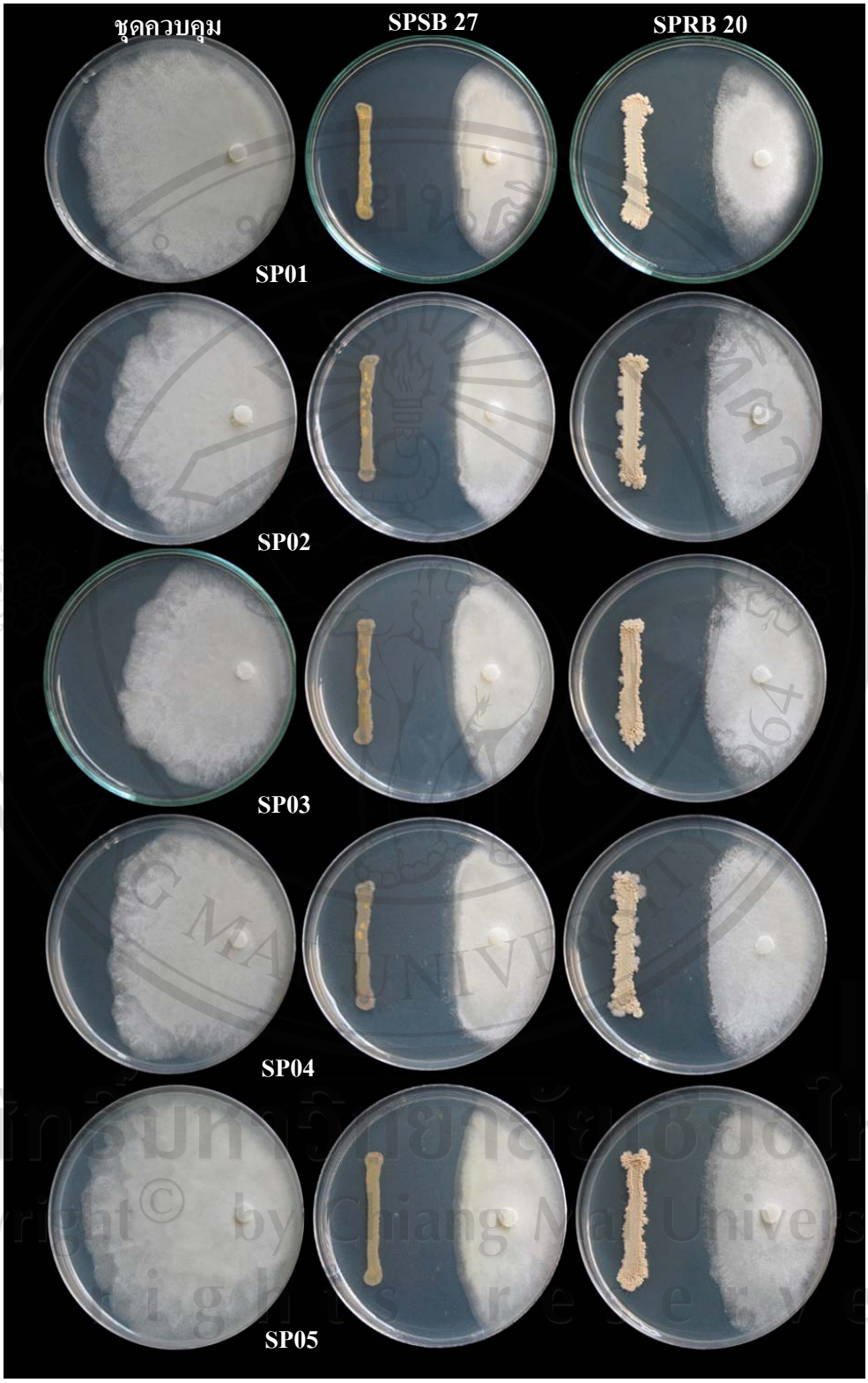
ตาราง 4 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในห้องปฏิบัติการ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งในเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลท[1]	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	
	SPSB 27	SPRB20
SP01	65.28 a [2]	60.84 abc
SP02	62.76 ab	56.63 bc
SP03	65.00 a	59.50 abc
SP04	62.63 ab	56.07 c
SP05	65.22 a	58.27 bc
LSD (P=0.01)	6.28	
CV (%)	5.23	

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



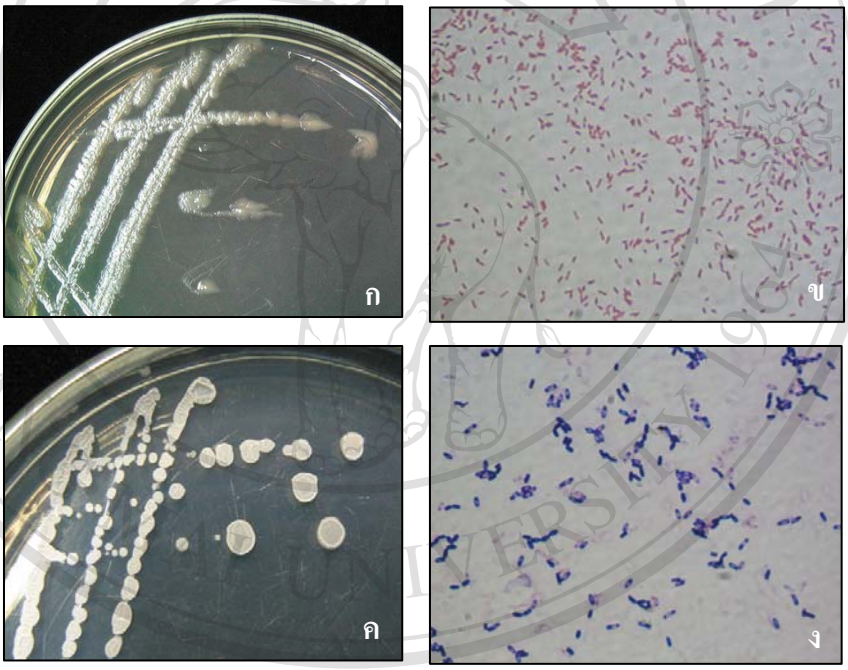
ภาพ 10 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลทได้แก่ SPSB 27 และ SPRB 20 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าในไอโซเลท SPSB 27 ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA มีสีเหลือง ขนาดเล็ก ผิวหน้าโคโลนีนูน ขอบเรียบ เมื่อเก็บไว้นานจะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วง ลักษณะการติดสีแกรมติดสีแดง ส่วนไอโซเลท SPRB 20 ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA มีสีขาวขุ่น เป็นเมือก รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวหน้าโคโลนีขรุขระเป็นรอยย่น ขอบเรียบ ผิวนูนเล็กน้อยจากผิวหน้าอาหาร ลักษณะการติดสีแกรมติดสีม่วง (ภาพ 11)



ภาพ 11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร NA

ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27

ข. การติดสีแกรมลบ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ค. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20

ง. การติดสีแกรมบวกของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp.ซึ่งได้แก่ SPSB 27 และ SPRB 20 มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี จากการทดสอบ catalase พบว่าเกิดฟองก๊าซทั้งสองไอโซเลท การทดสอบการย่อยแป้งพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท SPRB 20 ให้ผลบวกโดยทำให้อาหารเป็นสีน้ำเงิน ส่วนบริเวณรอบๆโคโลนีใส ไม่มีสี ส่วนไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลลบ โดยอาหารเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด (ตาราง 5 และภาพ 12 A) การทดสอบการใช้ซิเตรทพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ผลบวกโดยทำให้อาหาร Simmons citrate agar เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (ตาราง 5 และภาพ 12 B) ส่วนการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลบวกโดยเชื้อมีการเจริญกระจายไปยังแนว stab และเจริญบนผิวหน้าอาหาร motility agar (ตาราง 5 และภาพ 12 C) การทดสอบ Oxidation – fermentation test (O-F test) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลบวกโดยทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ส่วนไอโซเลท SPRB 20 อาหารเปลี่ยนสีเพียงเล็กน้อย (ตาราง 5 และภาพ 12 D) การทดสอบการหมักน้ำตาล arabinose พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลบวก การทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทให้ผลเป็นบวก โดยทำให้อาหารทดสอบเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู การทดสอบการหมักน้ำตาล manitol พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 ให้ผลเป็นบวก ส่วนการทดสอบ methyl red, indole และการทดสอบรีดิวซ์ไนเตรทพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลลบ การทดสอบ Voges-Proskaur พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลบวกโดยทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง การสร้างสาร pyocyanin ในอาหาร MNP พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ให้ผลบวก (ตาราง 5) และจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase และเอนไซม์ phosphatase พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ phosphatase ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 ไม่สร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสามารถสรุปได้เบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 อาจจัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* (*Aeromonas, Pseudomonas* หรือ *Vibrio*) ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* (ภาพ 13)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

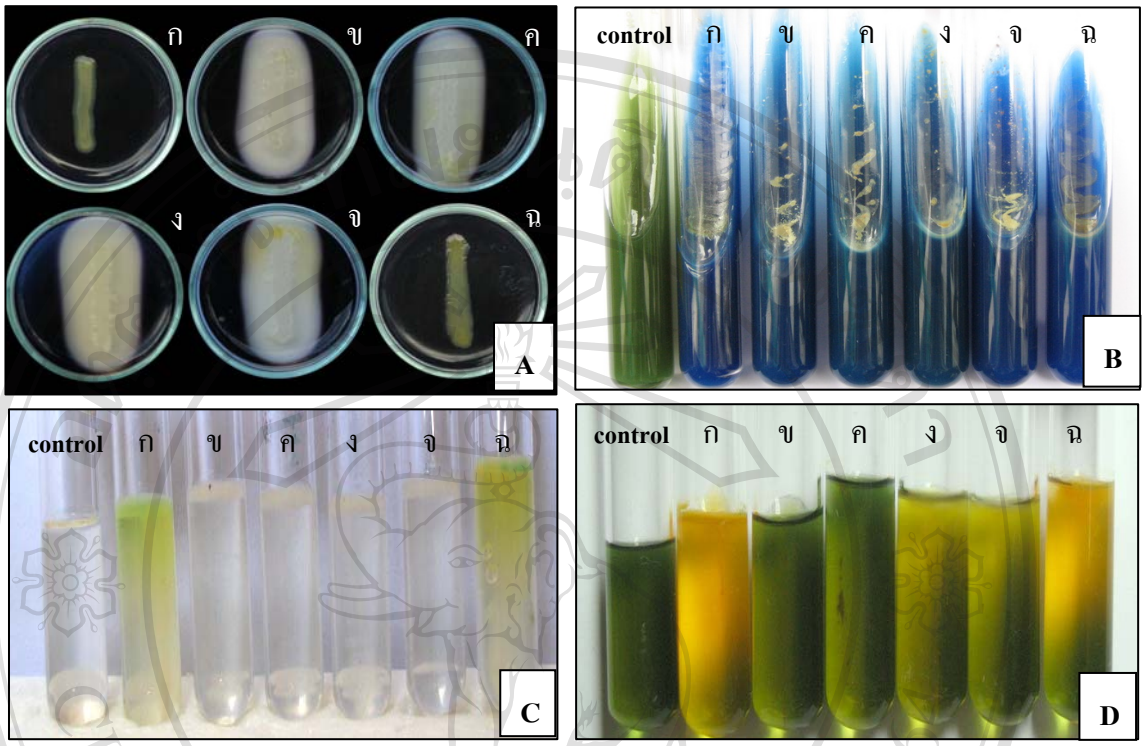
ตาราง 5 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

A. การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

B. การทดสอบการใช้ซิเตรท (Citrate utilization)

C. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่

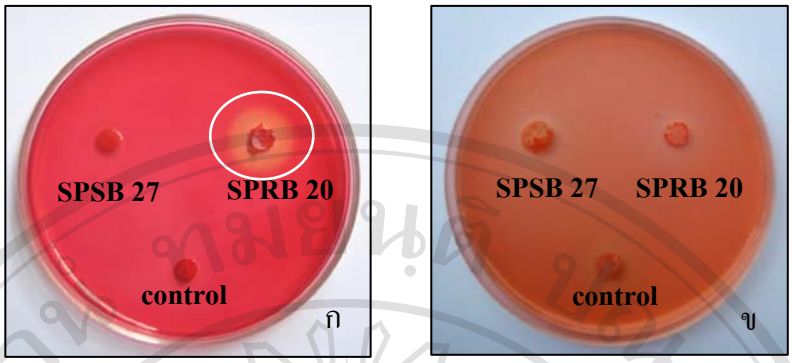
D. การทดสอบ Oxidation - fermentation (O-F test)

ก. *Pseudomonas aeruginosa* ข. *Bacillus amyloliguefaciens*

ค. *B. megaterium* ง. *B. subtilis*

จ. SPRB 20 ฉ. SPSB 27

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase และ เอนไซม์ phosphatase ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท SPSB 27 และ SPRB 20

ก. การสร้างเอนไซม์ cellulase ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 (เกิดวงใสบนอาหารทดสอบ)

ข. ไม่มีการสร้างเอนไซม์ phosphatase ในแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 และ SPRB 20

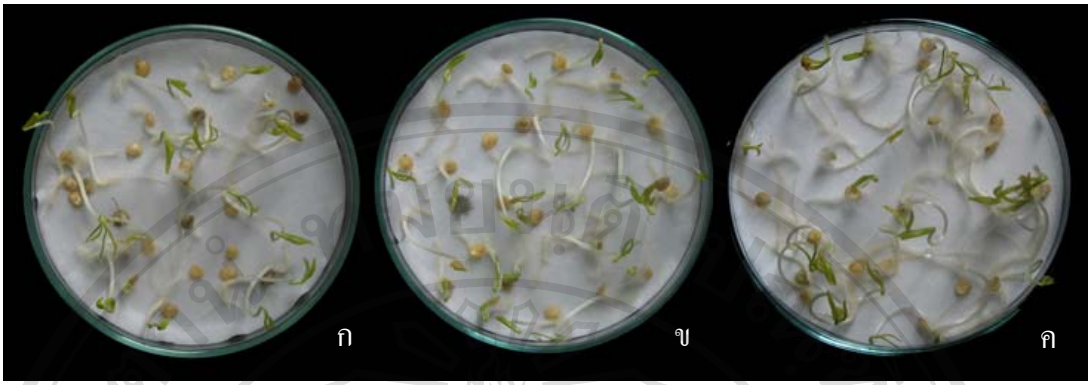
5.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

6. การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกหวาน

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลทได้แก่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 และ *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20 ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพริกหวานบนกระดาษชื้น พบว่าเมล็ดพริกหวานเริ่มงอกหลังจากเพาะเมล็ดได้ 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกภายหลังจากการเพาะ 14 วัน พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดเป็น 93 ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 90 ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (น้ำเปล่า) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 80 (ภาพ 14 และตาราง 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดพริกหวานภายหลังจากการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 14 วัน

ก. ชุดควบคุม

ข. *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20

ค. *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกหวานหลังจากเพาะบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 14 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกหวานหลังจากเพาะบนกระดาษชื้น[1]
ชุดควบคุม	80
B. amyloliquefaciens SPRB 20	93
P. aeruginosa SPSB 27	90

LSD (P=0.05) = 10.39

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายหลังจากการเพาะเมล็ดพริกหวาน 14 วันบนกระดาษชื้นได้นำต้นกล้าพริกมาชั่งน้ำหนักสดและแห้ง พบว่าทั้งสามกรรมวิธีคือการใช้ *Bacillus amyloliquefaciens* SPRB 20, *Pseudomonas aeruginosa* SPSB 27 และน้ำเปล่า (ชุดควบคุม) ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าไม่แตกต่างกัน โดยน้ำหนักสดชั่งได้เฉลี่ย 0.0475 - 0.0525 กรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักแห้งชั่งได้เฉลี่ย 0.0053 - 0.0059 กรัมต่อต้น ซึ่งผลการทดลองแสดงในตาราง 7 สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ทำให้การงอกของเมล็ดพริกหวานลดลง

ตาราง 7 น้ำหนักของต้นกล้าพริกหวานอายุ 14 วันที่เพาะบนกระดาษชื้น

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยของต้นกล้าพริกหวานหลังจากเพาะได้ 14 วัน (กรัม) [1]	
	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
ชุดควบคุม	0.0475 a [2]	0.0059 a
B. amyloliguefaciens SPRB 20	0.0475 a	0.0057 a
Ps. aeruginosa SPSB 27	0.0525 a	0.0053 a
LSD (*P*=0.05)	0.0080	0.0010
CV(%)	10.17	10.19

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานในสภาพเรือนทดลอง

7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 และผสมระหว่างไอโซเลททั้งสอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพริก เมื่อทำการวัดความสูงของต้นพริก ความยาวของราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ภายหลังจากการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่าง *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพริกดีที่สุด ซึ่งให้ความยาวรากสูงสุด โดยมีความยาวรากเป็น 19.28 เซนติเมตร ในขณะที่ความสูงของต้นเป็น 18.31 เซนติเมตรซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ที่ให้ความสูงของต้นเป็น18.28 เซนติเมตร ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งพบว่าในทุกกรรมวิธีให้น้ำหนักที่ไม่แตกต่างกัน โดยต้นพริกมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.88-1.13 กรัมและน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.17 - 0.19 กรัม กรรมวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 ให้ประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีความสูงของต้นเป็น 19.56 เซนติเมตร ความยาวรากเป็น 17.22 เซนติเมตรซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ที่มีความยาวรากเป็น 16.28 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมมีความสูงของต้นเป็น 17.26 เซนติเมตร และมีความยาวรากเป็น 14.75 เซนติเมตร (ตาราง 8 และภาพ 15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 ความสูง ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของพริกหวานหลังการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ราดบริเวณโคนต้น 28 วัน

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

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาพ 15 เปรียบเทียบต้นพริกหวานแต่ละกรรมวิธีหลังจากใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน

ก. ชุดควบคุม

ข. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20

ค. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. aeruginosa* SPSB 27

ง. ราดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่างไอโซเลท SPRB 20 และ SPSB 27

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *P. capsici*

จากการทดสอบประสิทธิภาพการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ร่วมกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 ในการควบคุมโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน แล้วตรวจผลการทดลองโดยวัดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 10 วันเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียวให้ระดับการเกิดโรคสูงสุดเป็น 3.70 รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 ที่มีระดับการเกิดโรคเป็น 2.8 และ 2.7 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่าง *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 มีระดับการเกิดโรคเป็น 2.20 และ 2.05 ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่าง *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 และ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. T 75 และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliguefaciens* SPRB 20 อย่างเดียวที่มีระดับการเกิดโรคเป็น 1.95 และ 1.65 ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุต้นพริกแสดงอาการปกติ (ตาราง 9 และภาพ 16)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *P.capsici* สาเหตุโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรค[1]
ชุดควบคุม	1.00[1] c[2]
ปลูกเชื้อสาเหตุ P	3.70 a
SPRB 20 + P	2.20 bc
SPRB 20 + T + P	1.65 bc
SPSB 27 + P	2.80 ab
SPSB 27 + T + P	2.70 ab
SPRB 20 + SPSB 27 + P	2.05 bc
SPRB 20 + SPSB 27 + T + P	1.95 bc
LSD (P=0.01)	1.43
CV (%)	36.29

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

P = เชื้อ *P. capsici* ไอโซเลท SP02

SPRB20 = *B. amyloliguefaciens* SPRB 20

SPSB 27 = *Ps. aeruginosa* SPSB 27

T = *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T 75

หมายเหตุ ระดับความรุนแรงของการเกิดโรค

1 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว

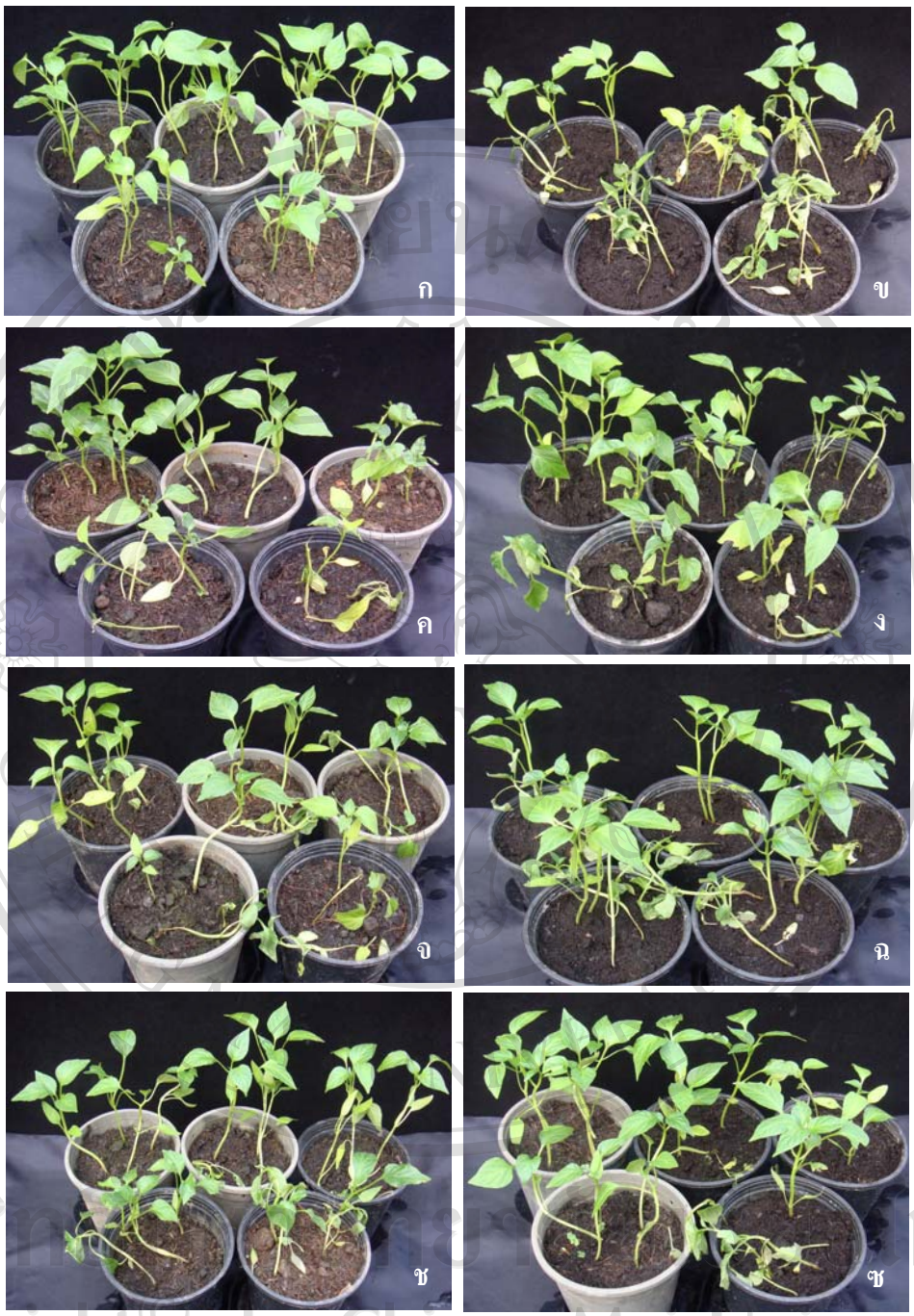
2 = รอยแผลสีน้ำตาล 1-10% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือเหี่ยวเล็กน้อย

3 = รอยแผลสีน้ำตาล 11-50% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือเหี่ยวชัดเจน

4 = รอยแผลสีน้ำตาล 50-100% ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง และ/หรือใบร่วง

5 = รอยแผลสีน้ำตาลขยายไปยังส่วนเหนือใบเลี้ยงหรือต้นพริกตาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 16 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในพริกหวานของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในแต่ละกรรมวิธี

ก. ชุดควบคุม ข. ปลูกเชื้อสาเหตุ P ค. SPRB 20 + P

ง. SPRB 20 + T + P จ. SPSB 27 + P ฉ. SPSB 27 + T + P

ช. SPRB 20 + SPSB 27 + P ซ. SPRB 20 + SPSB 27 + T + P

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved