บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานภายในโรงเรือนเพาะปลูกของเกษตรกร บ้านม่วงคำ ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ พบโรคนี้ในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของต้นพืช ในระยะต้นอ่อน เชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายบริเวณโคนต้น แผลจะมีลักษณะคล้ายโดนน้ำร้อนลวก ทำให้ต้นกล้าล้มพับลง รากเน่าและยอดแห้งตาย ส่วนอาการที่ผลจะช้ำแผลมีสีน้ำตาล และเน่า มีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมทั่วบริเวณ ซึ่งโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวาน เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกพริกหวานในโรงเรือนเป็นอย่างมาก โดยจะพบโรคกระจายเป็นหย่อมๆ ซึ่งเชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยน้ำฝนทำให้บริเวณดังกล่าวเกิดโรค ทำให้ต้นพริกหวานเหี่ยวส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต นอกจากนี้ยังพบโรคระบาดรุนแรงในโรงเรือนที่ไม่มีการจัดการที่ดี เนื่องจากเชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดย ลม น้ำ และเครื่องมือการเกษตรต่างๆ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถอยู่ข้ามฤดูในเศษซากพืชซึ่งเกษตรกรนำขุยมะพร้าวเก่ามาใช้ซ้ำซึ่งส่งผลทำให้ต้นพริกหวานเกิดโรคนี้ตั้งแต่ระยะกล้า เหี่ยวและตายในสุด

เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อที่เป็นโรคด้วยวิธี free hand section พบ sporangium คล้ายผลมะนาว ตรงปลายมองเห็น papilla ชัดเจน ซึ่งตรงกับรายงานของ Babadoost (2004) เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทำการพิสูจน์การเกิดโรคโดยวิธี Koch's postulation กับต้นพริกหวานอายุ 60 วันพบว่าเชื้อ *Phytophthora* sp.ที่แยกได้จากพริกหวานทุกไอโซเลท ทำให้ต้นพริกหวานแสดงอาการเหี่ยว ใบเน่าและ คล้ายน้ำร้อนลวก ส่วนบริเวณโคนต้นเกิดแผลสีน้ำตาล ซึ่งลักษณะอาการของโรคแสดงอาการเหมือนกับอาการผิดปกติของพริกหวานที่นำมาแยกเชื้อ จากการศึกษาสามารถเก็บรวบรวมเชื้อ *Phytophthora* sp. ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SP01, SP02, SP03, SP04 และ SP05 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA โดยศึกษาลักษณะของโคโลนีและ sporangium ความกว้าง ความยาว และอัตราส่วน L/B ratio ตามวิธีการของ Pongpisutta และ Sangchote (2004) จากการศึกษาสามารถแบ่งลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ได้เป็น 3 แบบได้แก่ slightly stellate pattern, rosette pattern และ slightly petallate pattern ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Phytophthora* sp.ไอโซเลท SP01, SP03 และ SP05 มีลักษณะโคโลนีแบบ slightly stellate pattern ส่วนไอโซเลท SP02 มีลักษณะโคโลนีแบบ rosette pattern และ SP04 มีลักษณะโคโลนีแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

slightly petallate pattern ส่วนลักษณะของ sporangium พบได้หลายแบบเช่น 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 ถึง 1.38 ซึ่งตรงกับรายงานของ Babadoost (2004) ที่ทำการศึกษาโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในฟักทองพบว่าเกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* ในรัฐอิลลินอยส์ สหรัฐอเมริกา จึงเห็นได้ว่าเชื้อ *P. capsici* สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชได้หลายชนิด ดังนั้นเชื้อที่แยกได้จากพริกหวานได้ทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* sp. โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยการใช้ specific primer CAPFW (forward primer) (5' TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC 3') และ CAPRV2 (reverse primer) (5' TACGGTTCACCAGCCCATCA 3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 595 bp คือเชื้อ *P. capsici* ในไอโซเลท SP01, SP02, SP03 และ SP04 ที่แยกได้จากโคนต้นและวัสดุปลูกจากต้นที่เป็นโรค ส่วนไอโซเลท SP05 ที่แยกได้จากผลที่เกิดโรคไม่พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งจากการรายงานของ Andrés *et al*. (2003) พบว่าเชื้อ *Phytophthora nicotianae* สามารถเข้าทำลายพริกหวานได้โดยมีลักษณะอาการคล้ายกับการเข้าทำลายของเชื้อ *P. capsici*

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณต่างๆได้แก่ ผิวใบ ในใบ ผิวรากและส่วนต่างๆของพริกหวานสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งสิ้น 177 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ มีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 และ SPRB 20 ที่แยกได้จากส่วนลำต้นและรากมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp.ได้ทุกไอโซเลท Lumsden *et al*. (1995) ได้รายงานว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในการควบคุมโรคทางชีววิธีซึ่งจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชนี้สามารถป้องกันรากพืชไม่ให้ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุ เมื่อรากพืชไม่ถูกทำลายย่อมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอด โดยพบว่าการเจริญเติบโตของส่วนรากมีความสัมพันธ์กับการเจริญของส่วนยอด Russell (1977)

การศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยอาศัยคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวเคมีโดยการเทียบเคียงคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลทมีความแตกต่างกันทั้งรูปร่าง ขนาด และสี เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดงของ Safranin O รูปร่างเป็นแท่ง ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วงของ crystal violet รูปร่างเป็นแท่ง เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนผังการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง และแผนผังการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวก ง จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ SPSB 27 ในเบื้องต้นจัดอยู่ในกลุ่ม *Aeromonas, Pseudomonas* หรือ *Vibrio* เนื่องจากการทดสอบ oxidase ให้ผลบวก และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบการสร้างสาร Pyocyanin ซึ่งเป็นคุณลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonas พบว่าให้ผลบวกและผลการทดสอบคล้ายกับ *Pseudomonas aeruginosa* ที่นำมาเทียบเคียงจึงน่าจะสรุปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 อยู่ในกลุ่มของ *Pseudomonas* ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 20 มีคุณสมบัติทางเคมีแตกต่างกันเล็กน้อยกับแผนผังที่นำมาทดสอบ จึงสรุปเบื้องต้นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท SPSB 20 อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* และจากการนำไปจำแนกด้วยเครื่อง Biolog TM Microlog System, Release 4.2 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPSB 27 คือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* รายงานของ O' Sullivan และ O' Gara (1992) พบว่า *Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญได้อย่างรวดเร็วในบริเวณรากพืช ทำให้สามารถแก่งแย่งที่อยู่อาศัยบริเวณรากพืชได้รวดเร็วกว่าเชื้ออื่น ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท SPRB 20 คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* จากการศึกษาของ Williams and Asher (1996) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณราก (rhizosphere soil) มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางดินได้หลายชนิด สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee *et al.* (2008); Kildea *et al.* (2008); Schmidt *et al.* (2004) ได้รายงานถึงการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคโดยชีววิธี ซึ่งพบว่า *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุทั้งชนิดที่เป็น soilborne และ airborne เช่นโรค damping-off ที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. โรคไฟทอปธอร่าไบลท์และโรค septoria tritici blotch นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชที่เรียกว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR ซึ่ง Glick *et al.* (1999) รายงานว่า PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลาย species และหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งกลุ่มของ PGPR ส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Gluconacetobacter* และ *Serratia* โดย PGPR แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช หรือที่เรียกว่าความสัมพันธ์แบบ Symbiosis โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเข้าสู่รากพืชแล้วเกิดกระบวนการต่างๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Handelsman and Stabb (1996) ที่รายงานว่า PGPR มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระบบรากพืช โดยรากพืชจะสร้างสารประกอบคาร์บอนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย PGPR และ PGPR จะเข้าครอบครองรากพืชและช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชนอกจากนี้ยังสร้างสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุในดินอีกด้วย และอีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มที่อาศัยแบบอิสระในดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Free-living form) และจะพบอยู่ใกล้ๆบริเวณรากพืช โดยแบคทีเรียจำพวก PGPR จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น จากการทดลองครั้งนี้เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพต่อการงอกของเมล็ดพริกหวานโดยการเพาะบนกระดาษชื้น พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลท มีประสิทธิภาพดีต่อการงอกของเมล็ดพริก โดยให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Siddiqui and Mahmood (1999) และ Nelson (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับ PGPR ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในด้านการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด การเข้าครอบครองราก การพัฒนาของราก เพิ่มความยาวรากและการแตกแขนงของรากพืช การละลายธาตุอาหารในดิน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ของพริกหวานในสภาพเรือนทดลอง เริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชโดยการใช้สารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท และผสมระหว่างไอโซเลททั้งสอง ราดบริเวณโคนต้นพริกต้นละ 5 มิลลิลิตรซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ 10^8 cfu/มิลลิลิตร พบว่าหลังการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่ทำให้ต้นพริกหวานแสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด ทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นพริกโดยเพิ่มความสูงของลำต้น ความยาวราก ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมระหว่างสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมความยาวของรากและความสูงของลำต้น Siddiqui *et al.* (2008) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้หลายทาง เช่นตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตของพืช การสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชหลายชนิด การละลายสารอาหารในดินให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น (ชวนพิศ, 2544) ซึ่ง PGPR บางชนิดมีความสามารถในการละลายสารอาหารในดิน ซึ่งจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสที่เกี่ยวข้องกันการเจริญของพืช โดยเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการใช้ธาตุไนโตรเจนของพืช ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชมาก โดยรากพืชสามารถดูดไปใช้ในรูปไนเตรทและแอมโนเนียมไอออน สารประกอบไนโตรเจนที่พบในเนื้อเยื่อพืช มีทั้งที่เพิ่งดูดเข้าไปและยังไม่เปลี่ยนแปลง และอินทรีย์สารซึ่งมีการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จากไนเตรท แอมโมเนีย และยูเรียที่พืชดูดได้ อินทรีย์สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญและมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย คือ ฮอร์โมนพืช โดยฮอร์โมนพืชที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ คือ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinins) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยออกซินกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายขนาดของเซลล์ ควบคุมการแตกแขนงของราก ส่วนไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนพืชที่ช่วยส่งเสริมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบ่งเซลล์ การขยายขนาด ช่วยในการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการสร้างโปรตีน และช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร (ยงยุทธ, 2543) มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ซึ่ง Elsorra *et al*. (2007) รายงานว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสาร indole-3-acetic acid (IAA) ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวโพดได้ การศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตส แต่อาจมีการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในขั้นต้น ในส่วนของ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 ก็ไม่พบการผลิตเอนไซม์ฟอตฟาเตสและเซลลูเลส ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์เพียงสองชนิดเท่านั้น จากการศึกษาของ Tambong และ Hofte ในปี 2001 ที่พบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 สามารถสร้างสารฟีนาซีนซึ่งเป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ต้านทานเชื้อ *Pythium myriotylum* สาเหตุโรครากเน่าของเผือกได้ Gupta *et al*. (2002) พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* GRC_2 ที่แยกได้จากดินรอบรากมันฝรั่งสามารถผลิตสาร antifungal metabolites ได้หลายชนิดเช่น HCN (hydrocyanin acid), IAA (indote-3-acetic acid) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ นอกจากนี้ Buysens *et al.* (1996) รายงานว่าเชื้อ *P. aeruginosa* 7NSK2 สามารผลิตสารไซเดอโรฟอร์ได้ 2 ชนิด ได้แก่ pyoverdin, และ pyochelin เป็นต้น

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora capsici* พบว่าการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* SPRB 20 ให้ผลในการควบคุมโรคไฟทอปธอร่าไบลท์ในสภาพโรงเรือนได้ดีกว่าการใช้เชื้อ *Ps. aeruginosa* SPSB 27 และเมื่อมีการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่าช่วยลดระดับการเกิดโรคได้ดีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อ ซึ่งการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษา Mansour *et al.* (2008) ซึ่งทำการศึกษาควบคุมเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary โดยการใช้เชื้อรา *Trichoderma hazianum* ร่วมกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างเม็ดสเคอโรเตียมของเชื้อราได้ นอกจากนี้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองยังสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *S. sclerotiorum* ในการทดสอบการงอกของเมล็ด มะเขือเทศ ฟักทอง และมะเขือได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. capsici* ได้ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง ซึ่งงานทดลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัย เพื่อหาวิธีการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมี เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved