การศึกษาการควบคุมด้วยชีววิธี

ของโรคแอนแทรคโนสบนพริก *(Capsicum annuum.)*

STUDY OF BIOLOGICAL CONTROL

OF ANTHRACNOSE DISEASE ON CHILLI *(Capsicum annuum.)*

พฤศจิกา แย้มวารี

ภานุพงษ์ สุขวิพัฒน์

วิจิตรตรา ตังพิริยะพงศ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF BIOLOGICAL CONTROL

OF ANTHRACNOSE DISEASE ON CHILLI *(Capsicum annuum.)*

PUESJIKAR YAMWAREE

PANUPONG SUKAVIPAT

WIJITTA TANGPIRIYAPONG

A SPECIAL PROJECT EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการควบคุมด้วยชีววิธีของโรคแอนแทรคโนสบนพริก *(Capsicum annuum.)* Study of Biological Control of Anthracnose Disease on Chilli *(Capsicum annuum.)*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพฤศจิกา แย้มวารี รหัสนักศึกษา 58050793 นายภานุพงษ์ สุขวิพัฒน์ รหัสนักศึกษา 58050799 นางสาววิจิตรตรา ตังพิริยะพงศ์ รหัสนักศึกษา 58050813
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการ	
ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการควบคุมด้วยชีววิธีของโรคแอนแทรคโนสบนพริก *(Capsicum annuum.)*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพฤศจิกา แย้มวารี รหัส 58050793
	นายภานุพงษ์ สุขวิพัฒน์ รหัส 58050799
	นางสาววิจิตรตรา ตังพิริยะพงศ์ รหัส 58050813
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในพริก ในงานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 50 ไอโซเลทจากผิวของเม็ดพริกที่อุดมสมบูรณ์ไม่มีโรค แล้วนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค *C. gloeosprioides* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน (dual culture method) พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต A4 และ A35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคโดยเฉลี่ยได้ 37.5% และ 41% ตามลำดับ และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่า ไอโซเลทที่ A4 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และไอโซเลทที่ A35 เป็นยีสต์ จากนั้นจะนำมาทดสอบการควบคุมโรคบนเม็ดพริก โดยได้ผลว่า A4 และ A35 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ร้อยละ 70.83และ 62.50 ตามลำดับ ดังนั้นจะสรุปได้ว่าทั้งจุลินทรีย์ในธรรมชาติสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนเม็ดพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : โรคแอนแทรคโนส, จุลินทรีย์ปฏิปักษ์, *Colletotrichum*, พริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study of Biological Control of Anthracnose Disease on Chilli *(Capsicum annuum.)*
Students	Puesjikar Yamwaree Student ID 58050793
	Panupong Sukavipat Student ID 58050799
	Wijitta Tangpiriyapong Student ID 58050813
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Dr. Nattawut Rungjindamai

Abstract

Anthracnose disease (Anthracnose) is a destructive disease to chilli. Biological control is an alternative way to reduce the problems from using synthetic fungicides. This research aimed to study the effectiveness of antagonistic microorganism in controlling Anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. in chili. Fifty isolates of microorganism were isolated from peel of chilli. All isolates of microorganism were tested to inhibit fungal pathogens *C. gloeosprioides* in dual culture method. It was found that the A4 and A35 isolates were effective inhibition of the growth of pathogenic fungus by an average of 37.5% and 41%. Study of morphology of antagonistic microorganisms found that A4 isolate is a Gram-negative bacterium. And the isolate at A35 is yeast. After that, the disease control on the chilli granules was then tested. The results showed that A4 and A35 were able to inhibit the disease by 70.83% and 62.50% respectively. It can be concluded that both microorganisms in nature can control anthracnose disease on chilli.

Keywords : Anthracnose, Antagonistic microorganism, *Colletotrichum*, chilli

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้สำเร็จด้วยความอนุเคราะห์และการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทำงาน การตรวจทาน ตลอดจนชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้นพร้อมทั้งช่วยชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหา แก่คณะผู้จัดทำ เพื่อให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่สละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ แก่โครงงานพิเศษฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรบสั่งสอนและถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ที่ทำให้โครงงานพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนบุคลากร และพี่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ สำหรับการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อยหากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

พฤศจิกา แย้มวารี

ภานุพงษ์ สุขวิพัฒน์

วิจิตรตรา ตังพิริยะพงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง – ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	3
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ข้อมูลพื้นฐานของพริก	3
2.1.1 พริกจินดา	3
2.1.2 มูลค่าทางเศรษฐกิจ	3
2.1.3 จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในพริกจินดา	3
2.1.4 โรคแอนแทรคโนสบนพริกจินดา	4
2.1.5 อนุกรมวิธานของเชื้อ *Colletotrichum* spp.	5
2.2 การควบคุมศัตรูพืช	5
2.2.1 การควบคุมทางเคมี (Chemical Control)	5
2.2.2 การควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control)	6
2.2.3 การควบคุมทางกายภาพ (physical control)	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคจากเชื้อราที่แยกได้ 6

2.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture method) 6

2.3.2 หลักการพิสูจน์โรคหรือสมมติฐาน Koch's postulates 8

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 10

วิธีการดำเนินงานวิจัย 10

3.1 การเก็บตัวอย่าง 10

3.1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างพริก 10

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 11

3.2.1 อุปกรณ์ 11

3.2.2 สารเคมี 13

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13

3.3.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค 13

3.3.1.1 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากตัวอย่างพริก 13

3.3.1.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และทดสอบการเกิดโรคแอนแทรคโนสโดยวิธี Koch's postulates ของพริก 13

3.3.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส 14

3.3.2 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 14

3.3.2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากตัวอย่างพริก 14

3.3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคแอนแทรคโนส 14

3.3.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี Dual culture method 15

3.3.3.1 วิธีการคำนวณการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* spp. 15

3.3.4 การทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนตัวอย่างพริก 16

บทที่ 4 18

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการทดสอบการเกิดโรคแอนแทรคโนส โดยวิธี Koch's postulates ของพริก 18

4.2 ผลการแยกเชื้อปฏิปักษ์จากผิวของผลพริก 19

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี Dual culture method 25

4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 35

4.5 การระบุสายพันธุ์เชื้อราและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก 37

4.6 ผลการทดสอบการควบคุมทางชีวภาพบนพริก 39

บทที่ 5 42

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 42

5.1 สรุปผลการวิจัย 42

5.2 ข้อเสนอแนะ 42

อ้างอิง 44

ภาคผนวก 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงรายชื่อสถานที่ที่ไปเก็บตัวอย่างของพริกทั้งหมด 10 สถานที่ 11

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเกิดโรคซ้ำบนพริกโดยวิธี Koch's postulates 18

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงจำนวนของไอโซเลทของ biocontrol ที่เก็บได้จำนวน 50 ไอโซเลทจากทั้งหมด 19

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถแยกได้ออกมาจากผิวของเม็ดพริกทั้งหมด 50 ไอโซเลท 21-24

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบ Dual culture ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* sp. รหัส KM01 กับ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน 30-31

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบ Dual culture ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* sp. รหัส RM02 กับ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน 33-34

ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 39

ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในผลพริก 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะของแผลโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 4

รูปที่ 2.2 รูปแบบการทดสอบด้วยวิธี Dual culture method 7

รูปที่ 3.3 สถานที่ที่ไปเก็บตัวอย่างเพื่อหา Biocontrol ทั้งหมด 10 สถานที่ 10

รูปที่ 3.4 รูปแบบการวางเชื้อรา Colletotrichum spp. บนจานอาหาร PDA 13

รูปที่ 3.5 วิธี Dual culture ใช้ทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 15

รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* sp. รหัส KM01 ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน 26

รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* sp. รหัส RM02 ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน 27

รูปที่ 4.8 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของเชื้อราก่อโรคจำนวน 2 ไอโซลท 28

รูปที่ 4.9 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส รหัส KM01 (ด้านบน) และ RM02 (ด้านล่าง) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท 29

รูปที่ 4.10 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อปฏิปักษ์ (biocontrols) 35

รูปที่ 4.11 ผลการทดลองการก่อโรคในพริกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* 01 37

รูปที่ 4.12 ผลการทดลองการก่อโรคในพริกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 02 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

BCAs คือ Biological control agents

NA คือ Nutrient agar

NB คือ Nutrient broth

PDA คือ Potato dextrose agar

PDB คือ Potato dextrose broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

พริกเป็นพืชสำคัญทางด้านเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากพริกสามารถนำไปบริโภคได้ทั้งแบบผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป แต่พริกเป็นพืชที่อ่อนแอต่อโรคพืชหลายชนิด โดยเป็นปัญหาต่อเกษตรกรในหลายๆด้าน เริ่มตั้งแต่ระยะก่อนการเก็บเกี่ยวไปจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยว จากการศึกษาพบว่าโรคที่เป็นปัญหามากที่สุด คือ โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* sp. ที่สามารถเข้าทำลายต้นพริกได้ทุกระยะ ได้แก่ ต้น ใบ ดอก และผลพริก โดยเฉพาะอาการเป็นโรคที่ผลพริก จะทำให้สูญเสียผลผลิตมาก ดังนั้นเกษตรกรผู้ปลูกพริกจะคุ้นเคยเป็นอย่างดีกับอาการของโรคนี้ที่เรียกว่าแอนแทรกโนส ซึ่งขั้นตอนการควบคุม โรคแอนแทรคโนสจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผิวของเมล็ดพริกที่ปราศจากโรค เพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์และเส้นใยที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* sp.

งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสที่ก่อให้เกิดโรคในพริก โดยใช้วิธีการทางชีววิธี เพื่อลดการใช้สารเคมีและลดปัญหาสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ใช้งาน และสามารถเพิ่มผลผลิตทางเศรษฐกิจ ได้ผลพริกที่ปราศจากโรค ซึ่งการทดสอบนี้อาจเป็นทางเลือกในการลดใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดอันตรายอีกทั้งยังสามารถลดต้นทุนในการผลิตทางเกษตรกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากตัวอย่างพริก จากตลาดทั้งหมด 10 แห่ง ในประเทศไทย

2. เพื่อศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพริก

3. เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides.* จากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทั้งหมด 50 ไอโซเลท และคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลท

2. แยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท และคัดเลือกเชื้อราที่เจริญเติบโตดีที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลท

3. ทำการทดสอบ Dual culture ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp. กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และได้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้
3. จัดจำแนกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลพื้นฐานของพริก

2.1.1 พริกจินดา

พริกจินดาแดงมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Capsicum frutescens.* จัดอยู่ในกลุ่มพริกขี้หนูมีรสชาติเผ็ดกลาง มีผลโต สีสันสวยงาม โดยผลยังอ่อนอยู่จะมีสีเขียวแก่ และเมื่อสุกจะมีสีแดงเข้ม พริกจินดามีความสำคัญในฐานะพืชทางเศรษฐกิจ ใช้ได้ในรูปพริกแห้ง พริกสด หรือการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นต้น พริกจินดาแดงที่เป็นที่ต้องการมากและมีราคาแพงมีแหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เรืองอุไร, 2560)

2.1.2 มูลค่าทางเศรษฐกิจ

พริกมีความสำคัญทางเศรษฐกิจระดับโลก เป็นทั้งพืชเพื่อการบริโภคและประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างมากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมคนและสัตว์ ผลิตภัณฑ์ยา จึงทำให้พริกเป็นที่ต้องการมาก โดยราคาเฉลี่ยในตลาดทั่วไป เช่น ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี ตลาดศรีเมือง จังหวัดราชบุรี และตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี ราคาเฉลี่ยอยู่ที่กิโลกรัมละ 76 บาท

สุชีลา (2561) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ปลูกพริกมากที่สุดเป็นอันดับ 5 ของโลกประมาณโดยมีพื้นที่รวมประมาณห้าแสนไร่ ในช่วงปี 2559 มีแนวโน้มการส่งออกพริกมากขึ้น และพริกที่ปลูกมากที่สุดคือพริกจินดา จากการสำรวจพบว่าการส่งออกพริกในตลาดตลาดเติบโตขึ้นต่อเนื่องตลอดทุกปี มูลค่าการส่งออกมากขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เป็นซอสพริก ประเทศคู่ค้าที่สำคัญได้แต่ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น เยอรมนี แต่ขณะเดียวกันในประเทศไทยต้องนำเข้าพริกแห้ง เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป โดนนำเข้าจากจีน อินเดีย และพม่า ซึ่งนำเข้าสูงถึงสี่พันล้านบาท

2.1.3 จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในพริกจินดา

อุดม (2556) ผลผลิตทางการเกษตรของพริกจินดาถูกทำลายจากโรคหลายชนิด เช่น โรคยอดและกิ่งแห้ง โรครากและโคนเน่า โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* และโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) พบว่าแต่ละโรคนั้นจะมีเชื้อจุลินทรีย์ในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าส่วนใหญ่โรคพืชที่มีผลกระทบต่อภาคการเกษตรของการปลูกพริกที่สร้างปัญหามากที่สุดคือโรคแอนแทรคโนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรพิมล (2554) เชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Colletotrichum dematium.* และ *Colletotrichum gloeosporioides.* ราสกุล *Colletotrichum* spp. มีลักษณะขึ้นเป็นเส้นใยสีขาวบนจานอาหารแข็งรวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่น และราสกุลนี้เมื่อแก่มักมีเมือกเหลวสีครีม สีส้ม สีแดง หรือสีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือมีส่วนโป่งหรือยื่นออก การจัดจำแนกของราในกลุ่มนี้อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น สังเกตลักษณะสปอร์ การมีหรือไม่มีเดือย (setae) สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารต่างๆ ในทางวิทยาศาสตร์ปัจจุบันนิยมจำแนกโดยการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการจำแนก

กรวีร์ (2553) เชื้อรา *Phytophthora capsici.* ทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่า ลักษณะอาการโคนต้นและรากจะเน่า เกิดอาการเหี่ยวในระยะติดผล ผลมีลักษณะฉ่ำน้ำ เนื้อผลเป็นสีดำ ในขั้นรุนแรง จะเข้าทำลายเมล็ด และยืนต้นตาย

เชื้อรา *Fusarium oxysporum.* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองพริก (Fusarium wilt Disease) ลักษณะอาการเชื้อราทำลายรากพริกบริเวณใต้โคนต้นที่อยู่ระดับผิวดิน เมื่อเกิดโรคใบที่อยู่ตอนล่างในทรงพุ่ม หรือทรงพุ่มเหลือง และร่วงลงมา พริกเหี่ยวแห้ง

2.1.4 โรคแอนแทรคโนสบนพริกจินดา

พริกจินดา เป็นพืชที่ออนแอต่อโรคพืชหลายชนิด โดยโรคที่เป็นปัญหามากที่สุด ในการผลิตพริกของเกษตรกร คือ โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากเชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* sp. ซึ่งสามารถเข้าลายต้นพริกได้ทุกระยะ ตั้งแต่ ต้น ใบ ดอก และผลพริก โดยเฉพาะอาการเป็นโรคที่ผลของพริกซึ่งเป็นได้ง่าย

ที่มา : Saxena et.al 2016

รูปที่ 2.1 ลักษณะของแผลโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ก) ลักษณะแผลบริเวณผลพริก (ข) ลักษณะแผลบริเวณข้อต่อลำต้นและกิ่ง (ค) ลักษณะแผลที่เกิดบริเวณใบ

สุชีลา (2561) ลักษณะของโรคแอนแทรคโนสบนพริกทำให้ผลพริกจะมีอาการเริ่มเป็นแผลหรือจุดช้ำเป็นแอ่ง ยุบลง ลักษณะอาจกลมหรือไม่แน่นอน ขนาดมีตั้งแต่จุดเล็กๆ ไปจนเต็มความกว้างของผลพริก อาจมีเพียงแผลเดียวหรือหลายแผลก็ได้ แผลเหล่านี้ต่อมาจะแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์หรือโคนิเดีย เป็นจุดสีเหลืองส้มหรือน้ำตาลดำเป็นวงๆ เรียงซ้อนกันอยู่ที่แผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวเชื้อจะเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะ การเจริญตั้งแต่เริ่มเป็นผลเล็กๆ จนโตเต็มที่และสุกแดง แล้วหากเป็นระยะที่ยังอ่อนเซลล์บริเวณแผล ซึ่งถูกทำลายจะหยุดการเจริญเติบโต ส่วนรอบๆจะเจริญไปเรื่อยๆ ทำให้เกิดอาการคดโค้งงอหรือบิดเบี้ยวขึ้นโดยมีแผล หรือเซลล์ที่ตายอยู่ด้านใน ลักษณะแห้งกร้าน จึงทำให้นิยมเรียกกันว่าโรคกุ้งแห้ง

2.1.5 อนุกรมวิธานของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

พรพิมล (2554) *Colletotrichum* spp. เป็นเชื้อราจัดอยู่ใน Subdivision Deuteromycotina, Class Coelomycetes, Order Melanconiales, Family Melanconiaceae ลักษณะทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้ คือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือมีสีตั้งแต่น้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลแก่ เส้นใยแตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น(septate) ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) มีลักษณะเซลล์เดียว ไม่มีสีไม่มีผนังกั้น (ยกเว้นขณะ germination) ลักษณะตรง หรือโค้งงอ มีรูปร่างหลายแบบเกิดบนก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) ซึ่งมี กำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า acervulus ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออกโคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู เหมือนลักษณะเชื้อ *Colletotrichum* spp. ของโรคแอนแทรคโนสที่แสดงออกมา

2.2 การควบคุมศัตรูพืช

2.2.1 การควบคุมทางเคมี (Chemical Control)

การควบคุมโรคพืชมีอยู่หลายวิธีแต่วิธีที่เกษตรกรนิยมใช้คือการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ซึ่งวิธีนี้อาจทำได้ง่าย และได้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียหลายอย่าง เนื่องจากปัญหาสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อระบบนิเวศ นอกจากนั้นสารเคมียังสามารถสะสมก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

สมเกียรติ (2553) สารเคมีกำจัดศัตรูพืชหมายถึงสารหรือส่วนประกอบที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น หรืออาจสกัดจากธรรมชาติออกมาในรูปของสารเคมี มีประสิทธิภาพในการป้องกันควบคุม และทำลายศัตรูพืช อันได้แก่ เชื้อก่อโรค แมลงศัตรูพืช และสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรค สารเคมียังแบ่งได้หลายประเภท สารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดเชื้อรา สารกำจัดหนูหรือสัตว์กัดแทะ สารเคมีจะแยกความรุนแรงตามที่กระทรวงสาธารณสุข จะแยกความรุนแรงระดับของพิษเป็น ระดับเอ (A) หมายถึงร้ายแรงที่สุด ระดับบี (B) หมายถึงร้ายแรงระดับร้ายแรงปานกลาง ระดับซี (C) หมายถึงร้ายแรงเล็กน้อย และระดับดี (D) หมายถึงรุนแรงน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control)

นิพนธ์ (2553) การควบคุมทางชีวภาพคือการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้สิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์มายับยั้งทำลายเชื้อก่อโรคเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้มีกลไกการยับยั้งหลายชนิดเพื่อควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

บรรพต (2555) การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีหรือการควบคุมโดยชีววิธี เป็นกลยุทธ์หนึ่งของการควบคุมศัตรูพืช ซึ่งมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ไรศัตรูพืช สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญทางการเกษตร การแพทย์และสาธารณสุข โดยไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช การควบคุมศัตรูพืชแบบประยุกต์มีรูปแบบต่างๆ การควบคุมโดยการใช้จุลินทรีย์ต้องผ่านการศึกษาวิจัยทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคพืช จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถพบได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส สายพันธุ์ของจุลินทรีย์เหล่านี้หลายชนิด สามารถแยกเชื้อออกมาผลิตเป็นการค้าและมีจำหน่ายในท้องตลาด ที่เรียกกันว่า “ยาเชื้อ” ที่สามารถนำมาใช้เช่นเดียวกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้

2.2.3 การควบคุมทางกายภาพ (physical control)

สมปอง (2536) นักวิชาการได้พัฒนาและนำความรู้ทางด้านกายภาพ เช่น ความรู้เรื่องความร้อน แสง เสียง คลื่น รังสีมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดจะช่วยป้องกันการกำจัดศัตรูพืชได้เช่น การใช้กับดักแสงไฟ การเก็บ รักษาเมล็ดพันธุ์ในห้องควบคุมอุณหภูมิการฉายรังสีเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช วิธีเหล่านี้มีข้อดีคือ ไม่ให้มีสารพิษตกค้าง แต่เสียค่าใช้จ่ายสูง และบางครั้งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคจากเชื้อราที่แยกได้

2.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture method)

ในการทดสอบได้แยกเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส คือ เชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคของ พริกชี้ฟ้า แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยก่อนหน้า นี้โดยวิธี Dual culture ซึ่งทำการทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุมที่ใช้จะวางเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ส่วนชุดทดสอบจะวางเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่เลือกไว้นำมาทดสอบ จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-27องศา

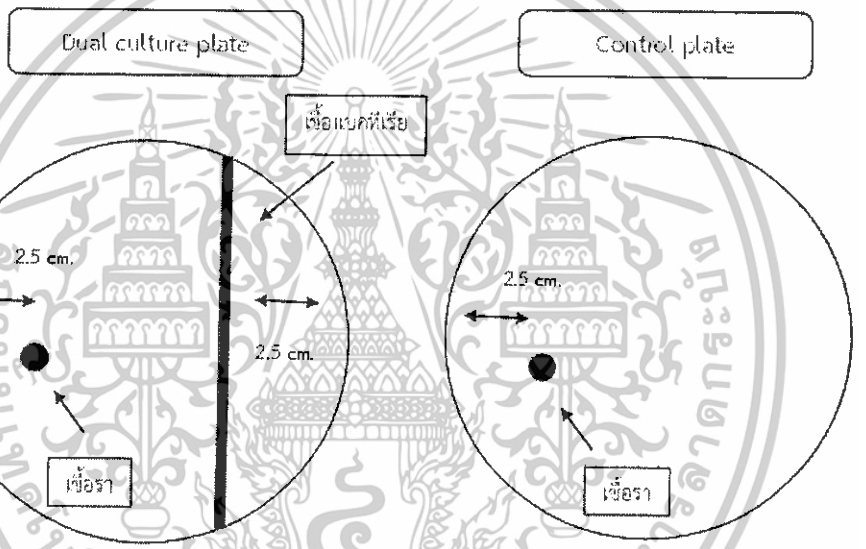
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อครบกำหนดจะทำการวัดความยาวรัศมีของเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับเชื้อแบคทีเรีย แต่ละไอโซเลท เทียบกับจานอาหารที่ไม่ลงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Control) โดยวัดค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง คำนวณได้จากสูตร ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยวัดค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรโดยทำการทดสอบอย่างน้อย3ซ้ำ

ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = [(R1-R2/R1)] ×100

เมื่อ R1 คือ รัศมีของเชื้อราที่ไม่ได้เลี้ยงคู่กับแบคทีเรียทดสอบ (control)

R2 คือ รัศมีของเชื้อราที่เลี้ยงคู่กับแบคทีเรียทดสอบ (Skidmore and Dickinson, 1976)



รูปภาพ ก. รูปภาพ ข.

รูปที่ 2.2 รูปแบบการทดสอบด้วยวิธี Dual culture method (ก) รูปแบบการวางของเชื้อราและแบคทีเรีย (ข) รูปแบบการวางเชื้อราที่เป็นชุดควบคุม

Holt et al. (1994) ทดสอบโดย Dual Culture Technique ซึ่งเชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum* sp. ไม่แผ่รัศมีไปยังสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อได้ หลังจากนั้นนำเชื้อที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ไปตรวจสอบต่อไป Dual culture plate Control plate โดยวัดเชื้อจากขอบออกมา 2.5 ซม. และ เชื้อที่เป็นไบโอคอนโทลในภาพ คือ แบคทีเรีย ออกมา 2.5 ซม. จากนั้นสังเกตเทียบจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จานอาหารชุดควบคุมเพื่อสังเกตผล เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อก่อโรค นำเชื้อแบคทีเรีย นำมาตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา

2.3.2 หลักการพิสูจน์โรคหรือสมมติฐาน Koch's postulates

หลักการที่ใช้ในการพิสูจน์โรค ได้กำหนดขึ้นและได้รับการนำไปใช้โดยทั่วไปทั้งในวงการโรคพืช, คนและสัตว์ หลักการ ดังนี้

1. จะต้องพบเชื้อโรคในบริเวณที่แสดงอาการเป็นโรค
2. เชื้อนั้นสามารถที่จะแยกออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้
3. เมื่อนำเชื้อที่แยกได้นี้เพาะลงในพืชหรือสัตว์ปกติก็จะทำให้เกิดโรคชนิดเดิมนั้นได้
4. สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของโรคนั้นจากสัตว์หรือพืชทดลองกลับมาได้อีก

จากหลักการดังกล่าวนำมาประยุกต์ใช้กับงานทดลองโดยการตรวจสอบว่าบริเวณที่พบ *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในบริเวณที่แสดงโรค และเชื้อ *Colletotrichum* spp. ในงานทดลองสามารถแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ จากนั้นเชื้อโรคไปทดสอบในพริกแล้วพบว่าเกิดโรคแอนแทรคโนสดังเดิม และในขั้นตอนสุดท้ายสามารถแยกเชื้อจากพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสแล้วได้เชื้อ *Colletotrichum* spp. ดังเดิมจึงสรุปได้ว่าจำเป็นต้องใช้หลักการดังกล่าวในการทดสอบ

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณา (2536) การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกชี้ฟ้า (*Colletotrichum gloeosporiodes.*) โดยยีสต์ที่แยกจากผักและผลไม้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้าแดง ที่เกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporiodes* ด้วยยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิดที่แยกมาจากผักและผลไม้ได้แก่ *Pichia gulliermondii* ให้เป็น R13 *Candida musae* ให้เป็น R6 *Issatchenkia orientalis* ให้เป็น ER1 และ *Candida quercitrusa* ให้เป็น L2 (Chanchaichaovivat et al., 2007; 2008)เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์และสปอร์ราลงในเพลทอาหาร PDA และตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ต่อราบนผลพริกชี้ฟ้าแดงด้วยวิธีคอร์กบอเรอร์โดยการทำแผลบนผิวพริกที่ทำความสะอาดด้วยการแช่น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 5 นาที แล้วไปจุ่มเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 1 นาทีทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อแล้วจึงทำแผลบนพริกเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร เพาะเชื้อราและยีสต์ โดยใช้ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์รา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่ม 5 วัน พบว่า R13 และ ER1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดีเท่ากัน ซึ่งมากกว่า R6 และ L2 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบในพริกพบว่า R13 มีผลในการยับยั้งการก่อโรคมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 แหล่งเก็บตัวอย่างพริก

ทำการเก็บตัวอย่างพริกจินดาจากตลาดสดทั้งหมด 10 แห่ง (รูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1) จากนั้นนำตัวอย่างพริกมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างเดือนมกราคม 2562 ถึงมีนาคม 2562 โดยพริกที่นำมาศึกษาใน 2 หัวข้อย่อยคือ (1) การแยกเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* จากตัวอย่างพริก และ (2) การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากเม็ดพริก

รูปที่ 3.3 สถานที่ที่ไปเก็บตัวอย่างเพื่อหา Biocontrol ทั้งหมด 10 สถานที่ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงรายชื่อสถานที่ที่ไปเก็บตัวอย่างของพริกทั้งหมด 10 สถานที่

ลำดับ	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง
1	ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร	09/01/62
2	ตลาดชุกกุ่ม อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	15/01/62
3	ตลาดศรีเมือง อ.เมือง จ.ราชบุรี	22/01/62
4	ตลาดเทศบาลบ้านโป่ง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	29/01/62
5	ตลาดปฐมมงคล อ.เมือง จ.นครปฐม	07/02/62
6	ตลาดชัฏป่าหวาย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	15/02/62
7	ตลาดสดชะอำ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	21/02/62
8	ตลาดร่มหุบแม่กลอง อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม	01/03/62
9	ชุมชนตลาดบ่อบัว อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	14/03/62
10	ตลาดสามชุก จ.สุพรรณบุรี	28/03/62

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
2. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker)
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
6. ตู้เย็นห้องแลป (Laboratory refrigerator)
7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
8. ไมโครเวฟ (Microwave)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิติดลบ (Deep freezer)
10. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance)
11. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

13. ปิเปตแบบปริมาตร (Volumetric Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

14. ลูกยางปิเปต (Pipette Bulb)

15. หลอดทดลอง (Test Tube)

16. ฝาปิดหลอดทดลอง (Test Tube Cap)

17. ตะแกรงใส่หลอด (Test Tub Rack)

18. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask)

19.ขวดดูแรน (Laboratory Bottle)

20. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

21. หลอดหยดสาร (Dropper)

22. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

23. กระจกสไลด์ (Microscope Slide)

24. กระจกปิดสไลด์ (Cover Glass)

25. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100,1000 มิลลิลิตร

26. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge)

27. ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette Tip)

28. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

29. พาราฟิล์ม M (Parafilm M)

30. กล่องแบบชื้น (moist chamber)

31. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle and Loop)

32. ช้อนตักสาร (Spatula)

33. มีดผ่าตัด (Surgical Blade)

34. น้ำกลั่น (Demineral)

35. หลอดกาแฟ (Straws)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 สารเคมี

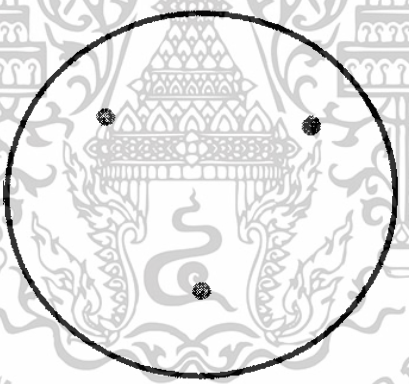
1. กลีเซอรอล
2. Tween 20
3. แอลกอฮอล์

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค

3.3.1.1 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากตัวอย่างพริก

นำพริกสด 3-5 เม็ดไปบ่มใน moist chamber ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีแผลจุดแห้งมีสีส้มขยายออกเป็นวงกลม พบเชื้อราสร้างเส้นใย จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยเชื้อราบริเวณที่มีแผลและมีสีส้มบนเม็ดพริก นำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) จำนวน 3 จุด พันจานอาหาร PDA ด้วย พาราฟิล์ม ทำซ้ำ 5 ครั้ง ระบุชื่อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น ไอโซเลทที่ 1-5 แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พร้อมทั้งสังเกตลักษณะของโคโลนี บันทึกลักษณะเชื้อราด้านบนและด้านล่างจานอาหารพร้อมทั้งถ่ายรูป



รูปที่ 3.4 รูปแบบการวางเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนจานอาหาร PDA

3.3.1.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และทดสอบการเกิดโรคแอนแทรคโนสโดยวิธี Koch's postulates ของพริก

นำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 2 ไอโซเลท ที่โคโลนีตรงกลางมีสีส้ม เส้นใยฟูมีสีขาวและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนจานอาหารPDA มากำหนดรหัสเป็น KM01 และ RM02 จากนั้นนำมาทดสอบการเกิดโรคซ้ำโดยการนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พริกสดจำนวน 4 เม็ด ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นวางพริกลงในกล่อง moist chamber ใช้เข็มเจาะบนพริกให้เกิดแผล จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อราวางลงบนพริก บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อจำลองสภาวะทางธรรมชาติของพริก เป็นเวลา 7 วัน ทำทั้ง 2 ไอโซเลท ซ้ำกันไอโซเลทละ 3 ซ้ำเหมือนกันทุกขั้นตอน สังเกตการเกิดแผลบนพริกและการสร้างเส้นใยเชื้อรา ถ่ายรูปและบันทึกผลการทดลอง

3.3.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส

เตรียมศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสี Lactophenol cotton blue โดยเขี่ยเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เชื้อมีอายุ 7-14 วัน โดยศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกผลที่ได้ด้วยการถ่ายรูป และบรรยายลักษณะต่างๆ ที่พบใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

3.3.2.1 การแยกเชื้อปฏิปักษ์จากตัวอย่างพริก

นำตัวอย่างของเม็ดพริกจากแต่ละแหล่งมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยคัดเลือกเม็ดพริกที่มีความสมบูรณ์ไม่เป็นโรค ล้างทำความสะอาดเม็ดพริกด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อและแอลกอฮอล์ 95% หลังจากนั้นแช่เม็ดพริกในสารละลาย tween 20 ความเข้มข้น 0.02% นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาเจือจางที่ $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ และนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปทำการ spread plate บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และทำการบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 72 ชั่วโมง และเลือกโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่เจริญบนอาหาร PDA ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์บนอาหาร PDA เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป

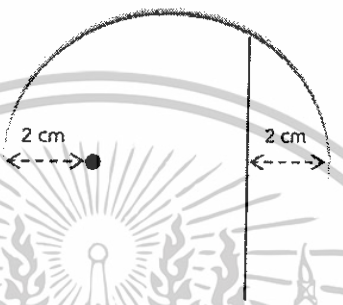
3.3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ควบคุมโรคแอนแทรกโนส

ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จัดจำแนกเบื้องต้นด้วยการศึกษาว่าเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ หากเป็นยีสต์ให้ศึกษาด้วยการย้อมสไลด์สดโดยการย้อมด้วยสี methylene blue ถ้าเป็นแบคทีเรียให้แบบแห้งด้วยการย้อมสีแกรม (Gram staining) หลังจากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นหลังสว่าง บันทึกผลด้วยการถ่ายรูปและเขียนบรรยายลักษณะที่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี Dual culture method

นำเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* spp. KM01 และ RM02 (จากหัวข้อ 3.3.1) ที่เก็บเกี่ยวจากพริกมาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จำนวน 50 ไอโซเลท (จากหัวข้อ 3.3.2) ทำการทดสอบบนอาหาร PDA ด้วยการแบ่งพื้นที่บนจานเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ฝั่ง (รูปที่ 3.4) ให้แต่ละฝั่งห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร โดยฝั่งซ้ายให้ใช้ปากกาจุดกำกับระยะ และฝั่งขวาใช้ไม้บรรทัดขีดเป็นเส้นตรงจากบนลงล่าง



รูปที่ 3.5 วิธี Dual culture ใช้ทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

แล้วใช้หลอดกาแฟ ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำไปวางด้านซ้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อตรงจุดที่กำหนด จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเพื่อลงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยการขีดเป็นเส้นตรงในแนวตั้ง ในทิศทางตรงกันข้ามกับเชื้อก่อโรค สำหรับชุดควบคุมใช้ชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุของโรคพริกทางฝั่งซ้าย และทางด้านตรงข้ามไม่มีการลงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยในการทดสอบของแต่ละไอโซเลท ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

3.3.3.1 วิธีการคำนวณการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* spp.

- หาค่าเฉลี่ยขนาดรัศมีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ค่าเฉลี่ย $= \frac{x_1+x_2+x_3}{x}$

x_n คือ ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)

n คือ จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อ่านผลการทดสอบยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนส

\+ คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนส

\- คือ ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $[\frac{(A-B)}{A} \times 100]$

A คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม

B คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 4 ระดับ

ระดับที่ 0 ไม่ยับยั้งโรคแอนแทรคโนส

ระดับที่ 1 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 1-15 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 2 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 16-30 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 31-45 เปอร์เซ็นต์

นำผลการวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพื่อใช้ในการเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ดีที่สุดมาเปรียบเทียบกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ที่มีผลในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสต่อต้นสตรอว์เบอร์รี มีการบันทึกผลการให้คะแนนความรุนแรง โดยดัดแปลงจากเอกสารของ สมพงษ์และคณะ (2014) โดยมีรายละเอียดของแต่ละระดับดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับที่ 1 = แสดงอาการของโรค 1 - 10 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 100-90)

ระดับที่ 2 = แสดงอาการของโรค 11 - 25 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 91-75)

ระดับที่ 3 = แสดงอาการของโรค 26 - 40 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 74-60)

ระดับที่ 4 = แสดงอาการของโรค 41 - 50 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 59-50)

ระดับที่ 5 = พืชแสดงอาการของโรคมากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 49)

3.3.4 การทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนตัวอย่างพริก

คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดเพียง 2 ไอโซเลท เพื่อมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งบนผลพริก โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท A4 และ A35 ทำด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และเขย่า 150 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่ในระยะ log phase หลังจากนั้นใช้ทิปพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะบนผิวพริกจำนวน 2 แผลต่อ 1 เม็ดพริก แล้วหยดเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไป 5 ไมโครลิตรต่อแผล รอจนแห้ง แล้วจึงลงเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* spp. ลงไป โดยหยดสารแขวนลอยของสปอร์ลงไปในแผลที่ลงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เอาไว้ก่อนหน้า หลังจากนั้นบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เม็ดพริกจำนวน 4 เม็ดต่อกล่อง ในแต่ละชุดการทดลอง ใช้พริกจำนวน 12 เม็ด (4 เม็ดต่อกล่อง จำนวนทั้งหมด 3 กล่อง) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน แล้วบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ ด้วยการนับจำนวนแผลที่ติดเชื้อเทียบกับจำนวนแผลทั้งหมดที่ทำไว้บนพริก สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นไร้เชื้อแทนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และทำซ้ำในจำนวนที่เท่ากัน

วิธีการคิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \left(\frac{x}{\text{จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เติมในพริก}}\right) \times 100$$

กำหนดให้ X = จำนวนแผลที่เกิดบนพริกแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการทดสอบการเกิดโรคแอนแทรคโนสโดยวิธี Koch's postulates ของพริก

จากการเก็บเกี่ยวเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนพริกที่มีแผล จากนั้นกำหนดรหัส คือ 01, 02, 03, 04 และ 05 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน สังเกตุลักษณะโคโลนีที่เป็นสีส้ม วนเป็นวงกลม มีเส้นใยฟูสีขาวและไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และเลือกเชื้อราไอโซเลทที่มีการเจริญเติบโตมากที่สุด จากนั้นนำไปทดสอบบนพริก โดยวิธีการทดสอบ Koch's postulates จำนวน 3 ซ้ำ แล้วอ่านผลที่ให้ค่าเป็น + คือ 01 และ 03 ที่แสดงเกิดโรคซ้ำบนพริกและเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเกิดโรคซ้ำบนพริกโดยวิธี Koch's postulates

ไอโซเลท	ผลการทดสอบ
01	+
02	-
03	+
04	-
05	-

หมายเหตุ + คือ เกิดโรคซ้ำบนพริกและเป็นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

- คือ เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนพริกมากำหนดรหัสสำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง คือ 01 แทน KM01 จากตลาดรุ่งโรจน์เจริญทรัพย์ จ.กาญจนบุรี และ 03 แทน RM02 จากตลาดเทศบาลบ้านโป่ง จ.ราชบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการแยกเชื้อปฏิปักษ์จากผิวของผลพริก

จากการทดลองสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกผิวของผลพริกด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร PDA จำนวน 50 ไอโซเลท จากทั้งหมด 10 ตลาด (ตารางที่ 4.3) เมื่อนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคแอนแทรคโนส โดยวิธี Dual Culture บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อจุลิทรีย์ที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลท คือ เชื้อปฏิปักษ์ที่ A4 (รูปที่ 4.10 (ก)) และ A35 (รูปที่ 4.10 (ค)) ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ และความสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดนั้นน่าจะเกิดจากกลไกที่สำคัญกลไกหนึ่งของยีสต์ปฏิปักษ์ คือ กลไกการแก่งแย่งสารอาหารและบริเวณพื้นที่อาศัยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้โคโลนีของราก่อโรคมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงจำนวนของไอโซเลทของ biocontrol ที่เก็บได้จำนวน 50 ไอโซเลทจากทั้งหมด 10ตลาดและไอโซเลทที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ของแต่ละตลาด

สถานที่	จำนวนไอโซเลทที่เก็บได้	ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค
1.ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพมหานคร	6	1
2.ตลาดชุกกุ่ม อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	4	2
3.ตลาดศรีเมือง อ.เมือง จ.ราชบุรี	4	0
4.ตลาดเทศบาลบ้านโป่ง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	4	0
5.ตลาดปฐมมงคล อ.เมือง จ.นครปฐม	5	0
6.ตลาดชัฏป่าหวาย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	6	2
7.ตลาดสดชะอำ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	5	0
8.ตลาดร่มหุบแม่กลอง อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม	5	1
9.ชุมชนตลาดบ่อบัว อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	6	1
10.ตลาดสามชุก จ.สุพรรณบุรี	5	1
รวม	50	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เราสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท แต่มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ แต่จะเลือกไอโซเลทที่ตรงตามเกณฑ์ที่เราตั้งไว้ โดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ

ระดับที่ 0 ไม่ยับยั้งโรคแอนแทรคโนส

ระดับที่ 1 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 1-15 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 2 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 16-30 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 31-45 เปอร์เซ็นต์

และจะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ในระดับที่ 3 คือ ยับยั้งโรคแอนแทรคโนสได้ 31-45 เปอร์เซ็นต์ และมีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ตัวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งโรคแอนแทรคโนสที่อยู่ระดับที่ 3 โดยเกณฑ์ที่เราใช้ดัดแปลงจากเอกสารของ สมพงษ์และคณะ (2014) โดยมีรายละเอียดของแต่ละระดับดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับที่ 1 = แสดงอาการของโรค 1 - 10 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 100-90)

ระดับที่ 2 = แสดงอาการของโรค 11 - 25 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 91-75)

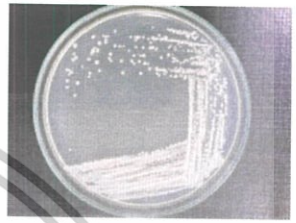
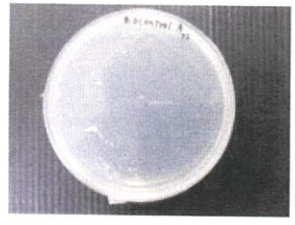
ระดับที่ 3 = แสดงอาการของโรค 26 - 40 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 74-60)

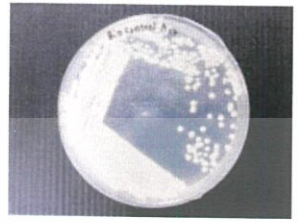
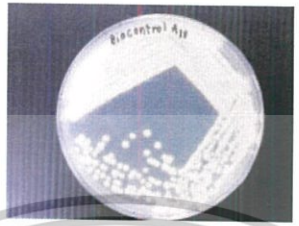
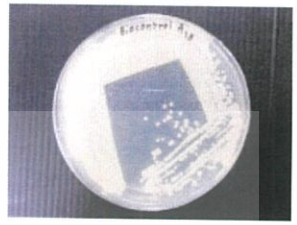
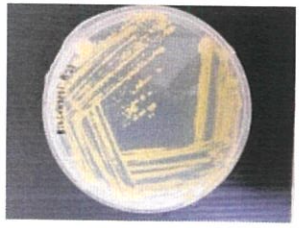
ระดับที่ 4 = แสดงอาการของโรค 41 - 50 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 59-50)

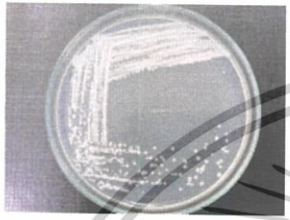
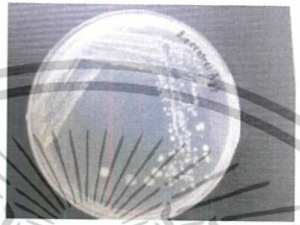
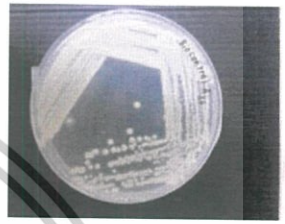
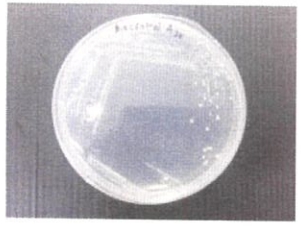
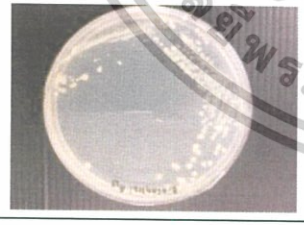
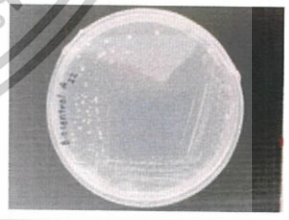
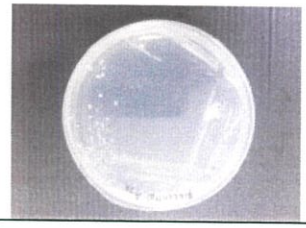
ระดับที่ 5 = พืชแสดงอาการของโรคมากกว่า 51 เปอร์เซ็นต์ (ยับยั้งร้อยละ 49)

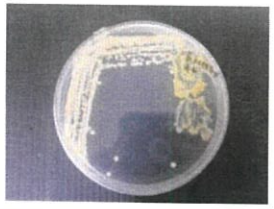
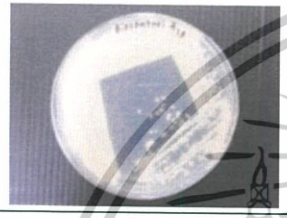
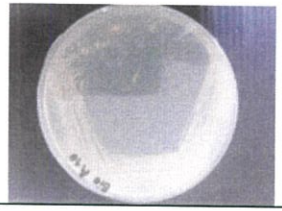
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถแยกได้ออกมาจากผิวของเม็ดพริกทั้งหมด 50 ไอโซเลท

				
Biocontrol A1	Biocontrol A2	Biocontrol A3	Biocontrol A4	Biocontrol A5
Biocontrol A6	Biocontrol A7	Biocontrol A8	Biocontrol A9	Biocontrol A10
				
Biocontrol A11	Biocontrol A12	Biocontrol A13	Biocontrol A14	Biocontrol A15

				
Biocontrol A16	Biocontrol A17	Biocontrol A18	Biocontrol A19	Biocontrol A20
				
Biocontrol A21	Biocontrol A22	Biocontrol A23	Biocontrol A24	Biocontrol A25
Biocontrol A26	Biocontrol A27	Biocontrol A28	Biocontrol A29	Biocontrol A30

				
Biocontrol A31	Biocontrol A32	Biocontrol A33	Biocontrol A34	Biocontrol A35
				
Biocontrol A36	Biocontrol A37	Biocontrol A38	Biocontrol A39	Biocontrol A40
				
Biocontrol A41	Biocontrol A42	Biocontrol A43	Biocontrol A44	Biocontrol A45

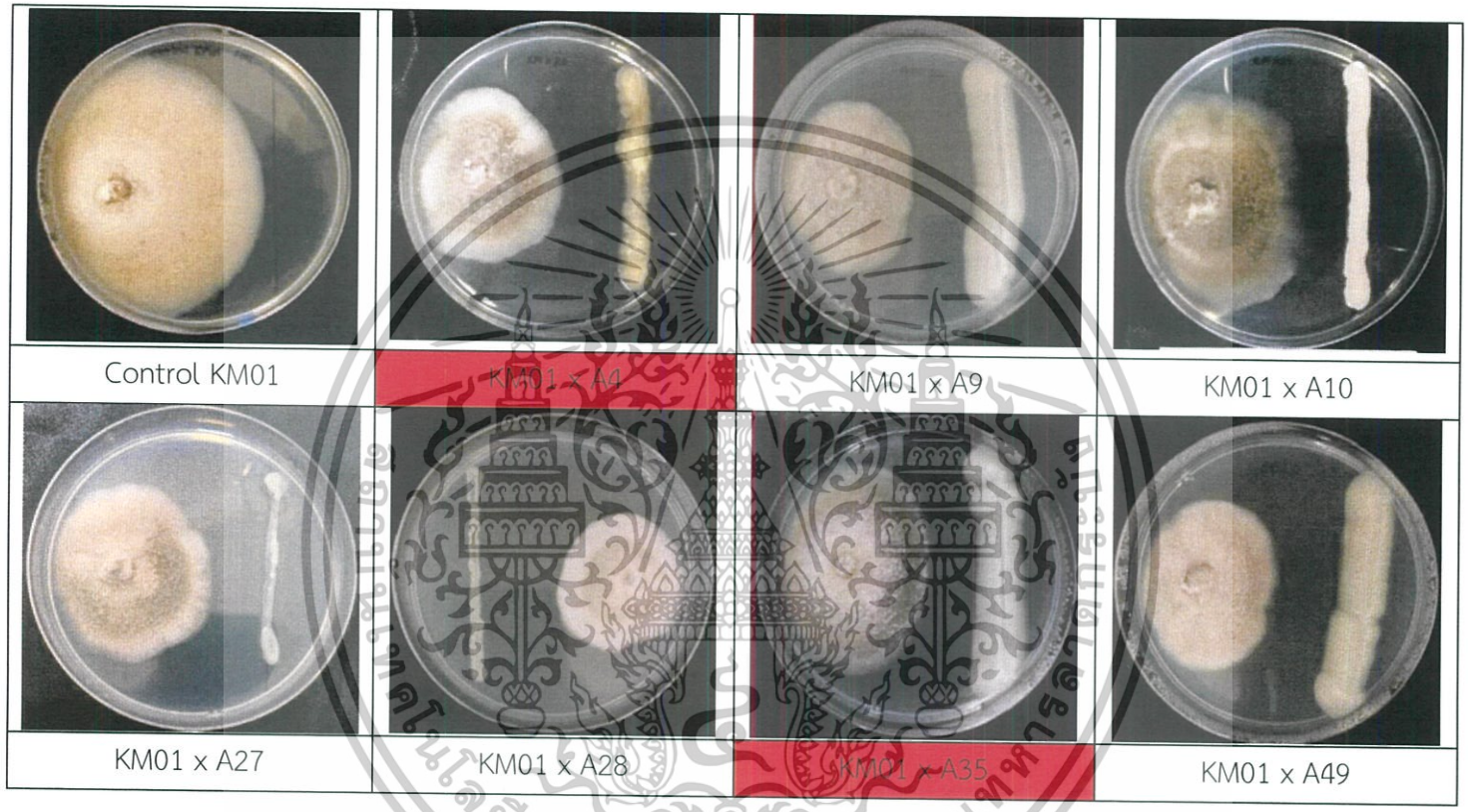
				
Biocontrol A46	Biocontrol A47	Biocontrol A48	Biocontrol A49	Biocontrol A50

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธี Dual culture method

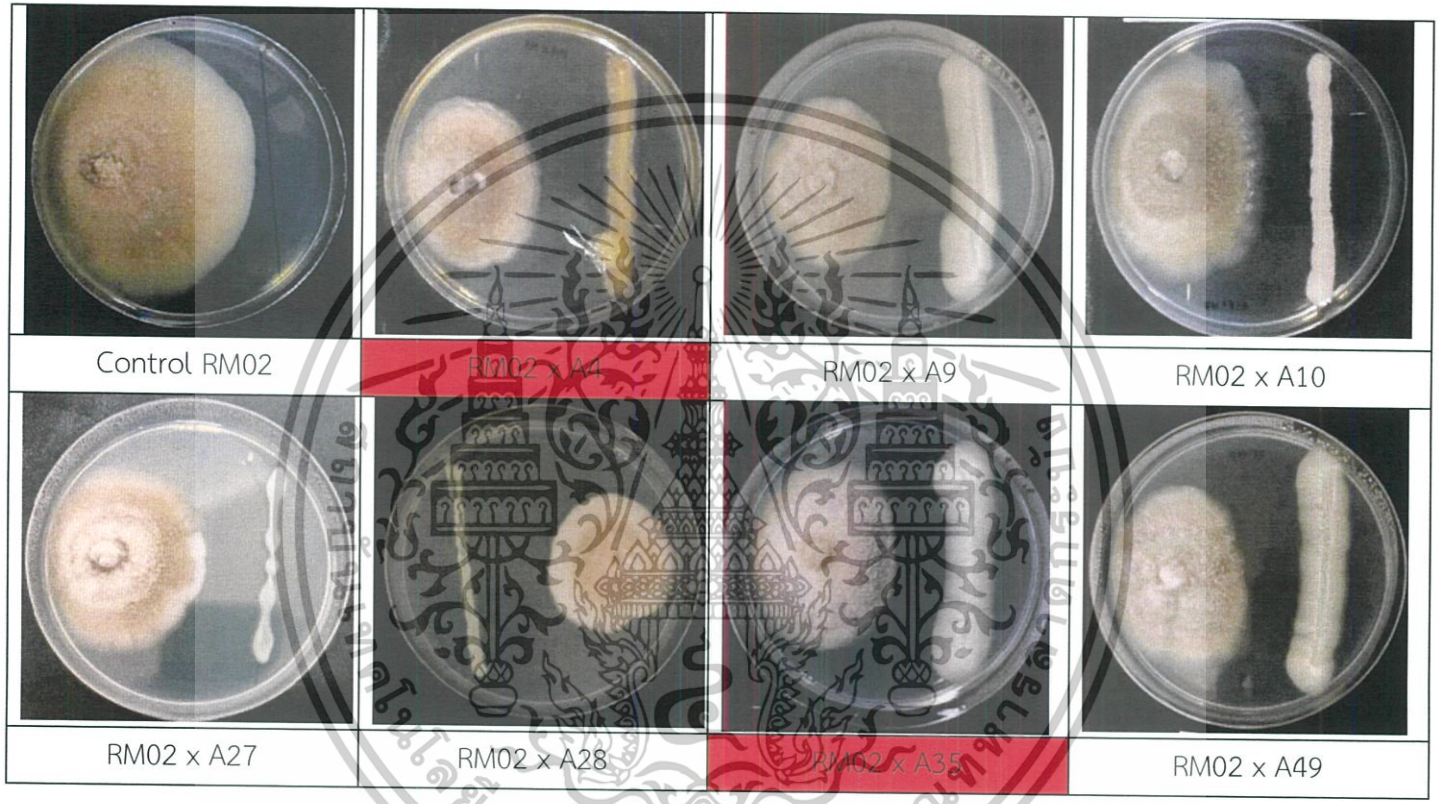
การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท คือ KM01 และ RM02 ซึ่งก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก ด้วยจุลินทรีย์ที่แยกจากเม็ดพริก จำนวน 50 ไอโซเลท บนจานเพาะเชื้อ และตรวจสอบความสามารถจากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บันทึกผลการทดสอบจากการวัดความยาวของรัศมีเชื้อรา และนำค่าเฉลี่ยความยาวของรัศมีเชื้อรามาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง(ตารางที่ 4.5 และ 4.6) โดยแบ่งช่วงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น 4 ระดับ คือ ระดับที่ 0 ไม่ยับยั้ง โรคแอนแทรคโนส ระดับที่ 1 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 1-15 เปอร์เซ็นต์ ระดับที่ 2 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 16-30 เปอร์เซ็นต์ ระดับที่ 3 แสดงการยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 31-45 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคได้ดีมี 3-5 ไอโซเลท (รูปที่ 4.9) แต่ได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดตามเกณฑ์การคัดเลือกที่ตั้งไว้ (หัวข้อ 3.3.4) คือ สามารถยับยั้งโรคแอนแทรคโนส 31-45 เปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรคแอนแทรคโนสทั้ง KM01 และ RM02 ต้องมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือก ไอโซเลท 04 คือ แบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 และ ไอโซเลท 35 คือ ยีสต์ไอโซเลทที่ A35 ผลการทดสอบระหว่าง KM01 x A04 ความสามารถในการยับยั้งโรคเท่ากับ 39 เปอร์เซ็นต์ RM02 x A04 เท่ากับ 44 เปอร์เซ็นต์ และ KM01 x A35 ความสามารถในการยับยั้งโรคเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ RM02 x A35 เท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5 และ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



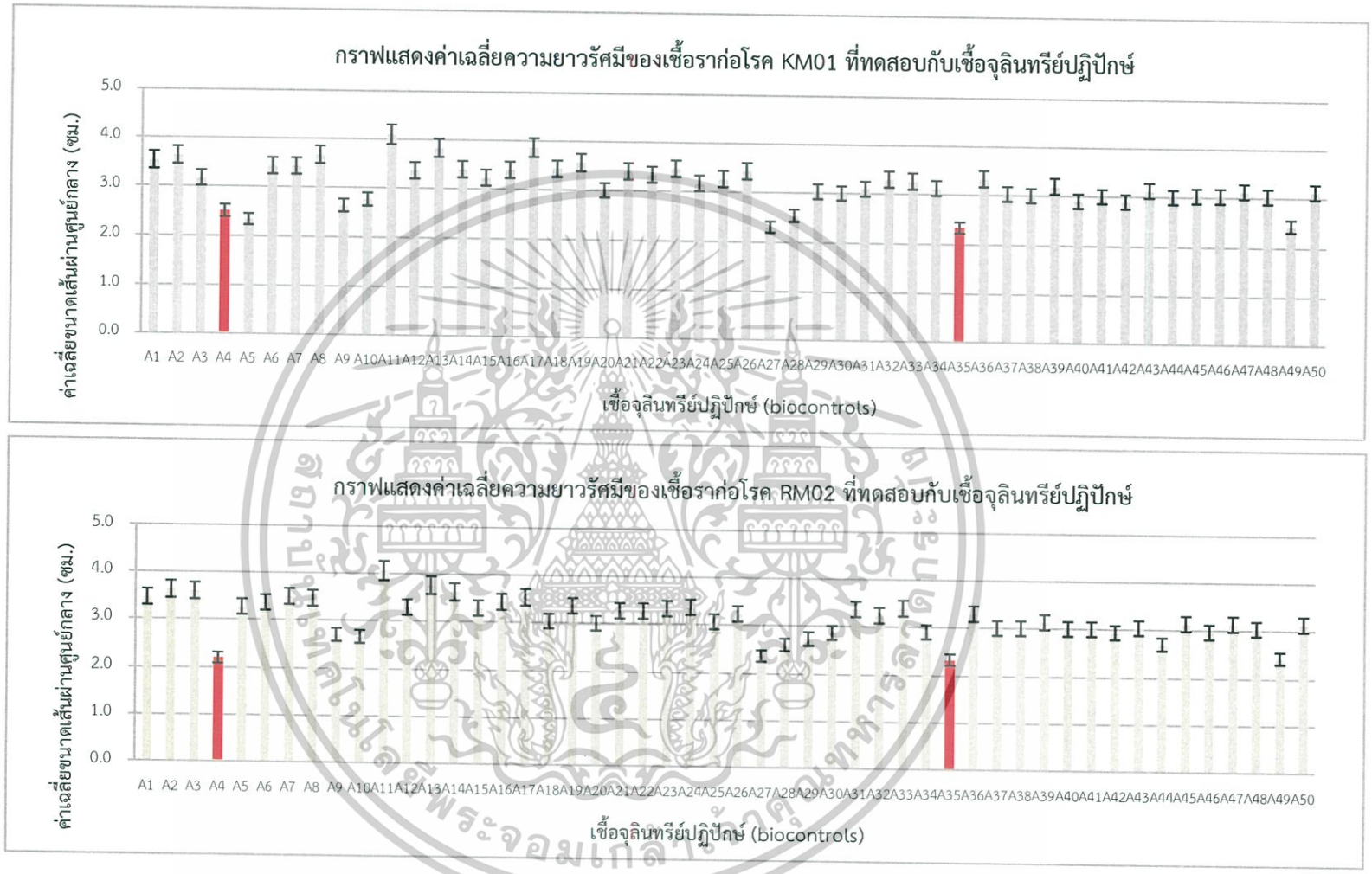
รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* sp. รหัส KM01 ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน

หมายเหตุ A04 คือ แบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 , A35 คือ ยีสต์ ไอโซเลทที่ A35

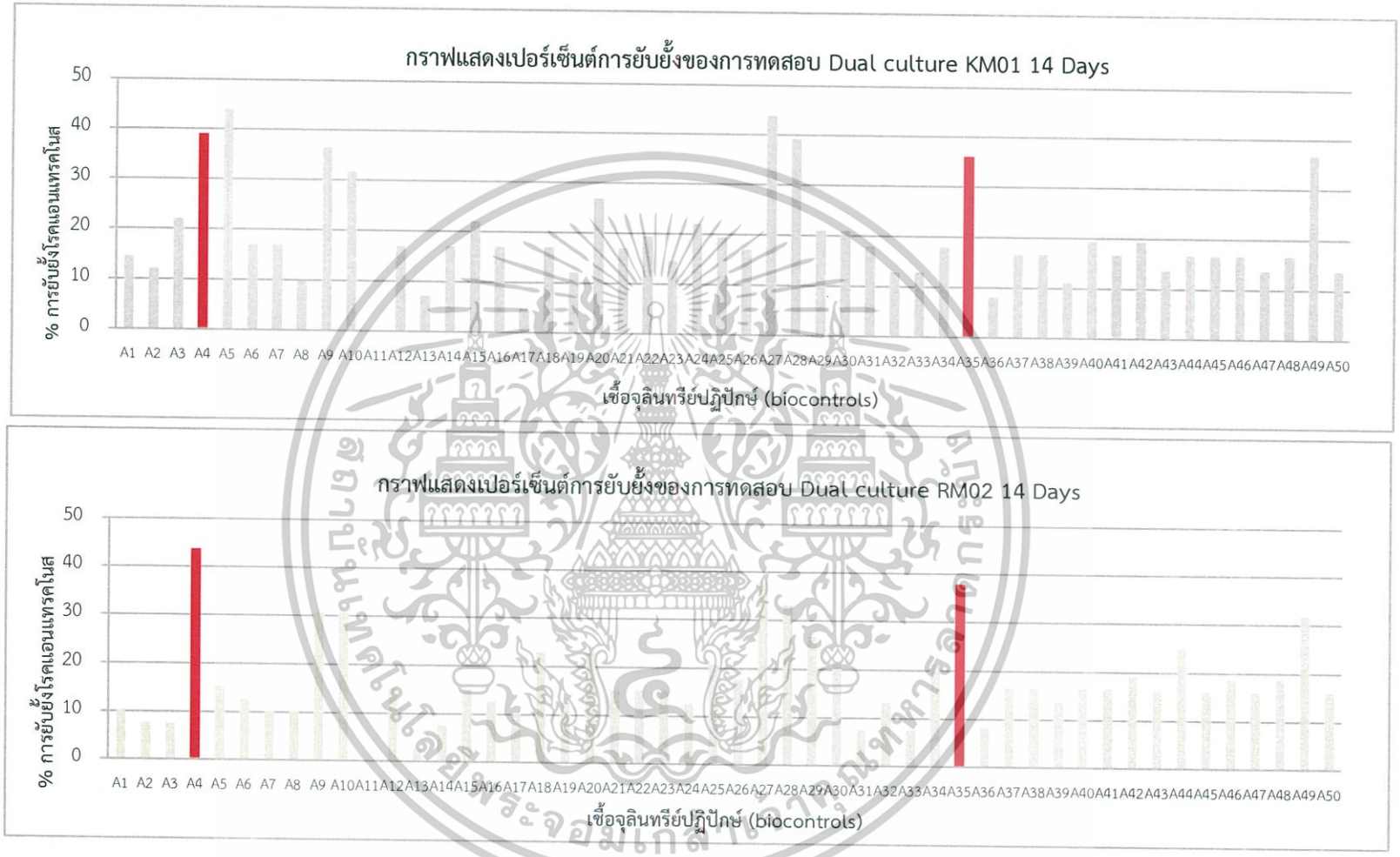


รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* sp. รหัส RM02 ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน

หมายเหตุ A04 คือ แบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 , A35 คือ ยีสต์ ไอโซเลทที่ A35



รูปที่ 4.8 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของเชื้อราก่อโรคจำนวน 2 ไอโซลท ที่ทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยวิธี Dual culture method โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน KM01 เท่ากับ 0.4 และ RM02 เท่ากับ 0.41 ตามลำดับ



รูปที่ 4.9 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส รหัส KM01 (ด้านบน)และ RM02 (ด้านล่าง) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท

* หมายเหตุ A11 ความสามารถในการยับยั้งเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งให้ผลติดลบ

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบ Dual culture ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* sp. รหัส KM01 กับ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน

ตารางผลการทดลองการทดสอบ Dual culture						
KM01	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา				% การยับยั้ง	ผลการทดสอบ
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (ซม.)		
A1	3.5	3.5	3.6	3.5	15	-
A2	3.6	3.6	3.7	3.6	12	-
A3	3.3	3	3.2	3.2	22	-
A4	2.5	2.5	2.5	2.5	39	+
A5	2.2	2.4	2.4	2.3	44	+
A6	3.4	3.4	3.5	3.4	17	-
A7	3.3	3.4	3.6	3.4	17	-
A8	3.6	3.6	3.8	3.7	10	-
A9	2.5	2.7	2.7	2.6	37	+
A10	2.7	2.8	2.8	2.8	32	+
A11	4	4	4.3	4.1	0	-
A12	3.2	3.4	3.5	3.4	17	-
A13	3.5	4	4	3.8	7	-
A14	3.2	3.5	3.5	3.4	17	-
A15	3.2	3.3	3.2	3.2	22	-
A16	3.3	3.4	3.5	3.4	17	-
A17	3.6	3.6	4.4	3.9	5	-
A18	3.3	3.5	3.5	3.4	17	-
A19	3.5	3.5	3.7	3.6	12	-
A20	2.9	3	3.1	3.0	27	-
A21	3.4	3.4	3.4	3.4	17	-
A22	3.2	3.4	3.4	3.3	20	-
A23	3.4	3.5	3.5	3.5	15	-
A24	3.1	3.2	3.2	3.2	22	-
A25	3.2	3.3	3.3	3.3	20	-
A26	3.4	3.4	3.5	3.4	17	-
A27	2.2	2.4	2.3	2.3	44	+
A28	2.4	2.6	2.6	2.5	39	+
A29	3	3	3.1	3.0	21	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผลการทดลองการทดสอบ Dual culture						
KM01	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา				% การยับยั้ง	ผลการทดสอบ
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (ซม.)		
A30	3	3	3	3.0	21	-
A31	3	3	3.3	3.1	18	-
A32	3.3	3.3	3.3	3.3	13	-
A33	3.2	3.3	3.3	3.3	13	-
A34	3	3.2	3.2	3.1	18	-
A35	2	2.5	2.5	2.3	36	+
A36	3.2	3.3	3.5	3.3	8	-
A37	3	3	3.1	3.0	17	-
A38	3	3	3	3.0	17	-
A39	3.2	3.2	3.2	3.2	11	-
A40	2.7	3	3	2.9	19	-
A41	3	3	3	3.0	17	-
A42	2.7	3	3	2.9	19	-
A43	3.1	3.1	3.2	3.1	14	-
A44	3	3	3	3.0	17	-
A45	3	3	3.1	3.0	17	-
A46	2.9	3.1	3.1	3.0	17	-
A47	3	3.2	3.2	3.1	14	-
A48	3	3	3.1	3.0	17	-
A49	2.4	2.4	2.5	2.4	37	+
A50	3	3.2	3.2	3.1	14	-

*** หมายเหตุ

รหัส KM01 คือ สถานที่เก็บตัวอย่างจากตลาดรุ่งโรจน์เจริญทรัพย์ จ.กาญจนบุรี

+ คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ 31-45 เปอร์เซ็นต์

- คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบ Dual culture ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* sp. รหัส RM02 กับ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 14 วัน

ตารางผลการทดลองการทดสอบ Dual culture						
RM02	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา				% การยับยั้ง	ผลการทดสอบ
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (ซม.)		
A1	3.4	3.5	3.5	3.5	10	-
A2	3.5	3.7	3.7	3.6	8	-
A3	3.9	3.5	3.4	3.6	8	-
A4	2.4	2.1	2.1	2.2	44	+
A5	3.2	3.3	3.3	3.3	15	-
A6	3.3	3.4	3.4	3.4	13	-
A7	3.8	3.2	3.5	3.5	10	-
A8	4	3.2	3.2	3.5	10	-
A9	2.6	2.7	2.8	2.7	31	+
A10	2.5	2.7	2.8	2.7	31	+
A11	4	4.2	4	4.1	0	-
A12	3.2	3.2	3.5	3.3	15	-
A13	3.5	3.8	4	3.8	3	-
A14	3.6	3.6	3.7	3.6	8	-
A15	3.3	3.3	3.3	3.3	15	-
A16	3.3	3.3	3.7	3.4	13	-
A17	3.2	3.4	4	3.5	10	-
A18	2.6	3	3.5	3.0	23	-
A19	3.2	3.4	3.5	3.4	13	-
A20	3	3	3	3.0	23	-
A21	3	3.4	3.4	3.3	15	-
A22	3.2	3.3	3.3	3.3	15	-
A23	3.2	3.4	3.4	3.3	15	-
A24	3.3	3.4	3.4	3.4	13	-
A25	3	3.1	3.1	3.1	21	-
A26	3.1	3.3	3.3	3.2	18	-
A27	2.1	2.4	2.6	2.4	38	+
A28	2.6	2.6	2.6	2.6	33	+
A29	2.7	2.7	2.8	2.7	27	-
A30	2.8	2.9	2.9	2.9	22	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผลการทดลองการทดสอบ Dual culture						
	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา				% การยับยั้ง	ผลการทดสอบ
RM02	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย (ซม.)		
A31	3.3	3.3	3.5	3.4	8	-
A32	3.2	3.2	3.3	3.2	14	-
A33	3.4	3.4	3.4	3.4	8	-
A34	2.9	2.9	2.9	2.9	22	-
A35	2	2.5	2.5	2.3	38	+
A36	3.2	3.2	3.5	3.3	8.3	-
A37	3	3	3	3.0	17	-
A38	3	3	3	3.0	17	-
A39	3	3.2	3.2	3.1	14	-
A40	3	3	3	3.0	17	-
A41	3	3	3	3.0	17	-
A42	2.8	3	3	2.9	19	-
A43	3	3	3.1	3.0	17	-
A44	2.5	2.7	2.9	2.7	25	-
A45	3	3.2	3.2	3.1	16	-
A46	2.9	3	3	3.0	19	-
A47	3	3.2	3.2	3.1	16	-
A48	3	3	3.1	3.0	19	-
A49	2.4	2.5	2.5	2.5	32	+
A50	3	3.2	3.2	3.1	16	-

*** หมายเหตุ

รหัส RM02 คือ สถานที่เก็บตัวอย่างจากตลาดเทศบาลบ้านโป่ง จ.ราชบุรี

+ คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ 31-45 เปอร์เซ็นต์

- คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

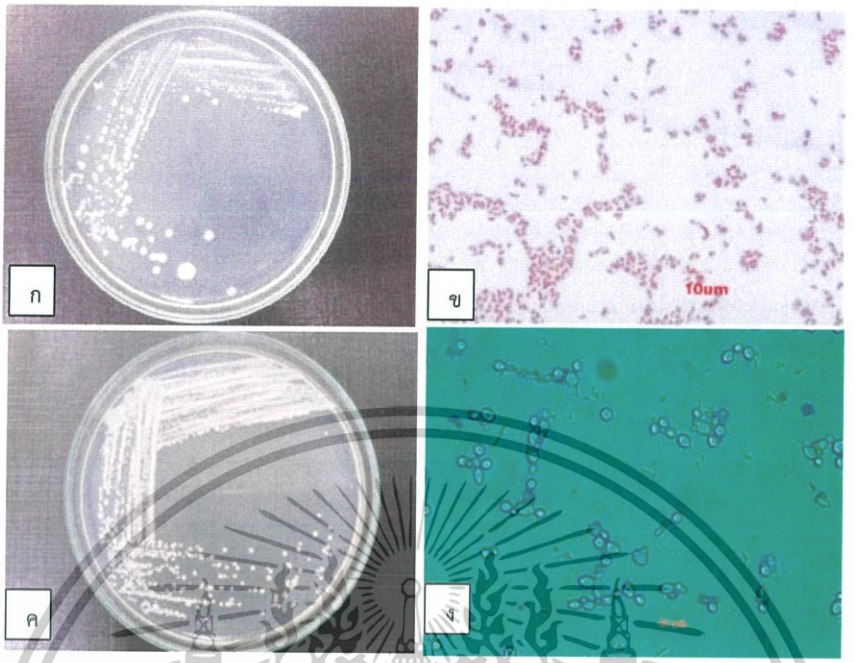
การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ ส่วนมากนิยมใช้เชื้อยีสต์และแบคทีเรียเป็นตัวควบคุมโรคมากกว่าเชื้อรา เนื่องจากนักวิจัยส่วนใหญ่ค่อนข้างมั่นใจว่ามีเชื้อยีสต์หลายชนิดที่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชหรือไม่ทำให้พืชเป็นโรค (Lima et al., 1997) รวมทั้งไม่สร้างสารพิษและมีคุณสมบัติในการแก่งแย่งอาหารได้ดี ได้แก่ *Debaryomyces* sp. , *Endomycopsis* sp. และ*Pichia* sp. เป็นต้น (วีระณีย์, 2555) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. มีการศึกษาและนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น สายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* (Fu et al., 2010) ซึ่งในผลการทดลองครั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย A04 ระบุได้ว่าเป็น *Enterobacter* sp. และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อรา *C.gloeosporioides* เช่นกัน อีกทั้งการทดสอบความสามารถของยีสต์ *P. guilliermondii R13* ที่มีความสามารถในการยับยั้งโคโลนีของเชื้อรา *C.gloeosporioides* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราในชุดควบคุมได้มากที่สุดร้อยละ 85.84 ที่จำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร ที่ความสามารถในการยับยั้งแตกต่างที่กับการทดลองของเรา โดยการทดลองมีประสิทธิภาพการยับยั้งร้อยละ 36 และ 38 ตามลำดับนั้น เนื่องจากว่าการทดลองนี้มีการกำหนดปริมาตรของเชื้อยีสต์ที่แน่นอน ทำให้มีประสิทธิภาพมากกว่าการที่ไม่ได้กำหนดปริมาตรการใช้ยีสต์ของการทดลองนี้(อรุณและจุรีมาศ,2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

A4

A35



รูปที่ 4.10 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อปฏิปักษ์ (biocontrols) (ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหาร PDA ไอโซเลทที่ A4 (ข) ลักษณะของไอโซเลทที่ A4 จากภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100x (ค) ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหาร PDA ไอโซเลทที่ A35 (ง) ลักษณะของไอโซเลทที่ A35 จากภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 100x

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนเม็ดพริกได้ โดยแยกเชื้อจากผิวบนเม็ดพริก ทั้งหมด 50 ไอโซเลท จากทั้งหมด 10 ตลาด และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak Plate พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดีที่สุด 2 ไอโซเลท คือ A4 และ A35 เมื่อนำมาแยกดูใต้กล้องพบว่า A4 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ และ A35 เป็นเชื้อยีสต์ เซลล์เดียวมีรูปร่างกลม โดยดูจากลักษณะของเชื้อที่ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับวิจัยอื่นที่ทำการแยกไอโซเลท ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มา 4 ชนิด ซึ่งแยกได้จากผักและผลไม้ในประเทศไทย ได้แก่ *Pichia guilliermondii* R13 *Candida musae* R6 *Issatchenkia orientalis* ER1 และ *Candida quercitrusa* L2 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ผลการวิจัยพบว่า ยีสต์ *P. guilliermondii* R13 มีประสิทธิภาพควบคุมการ

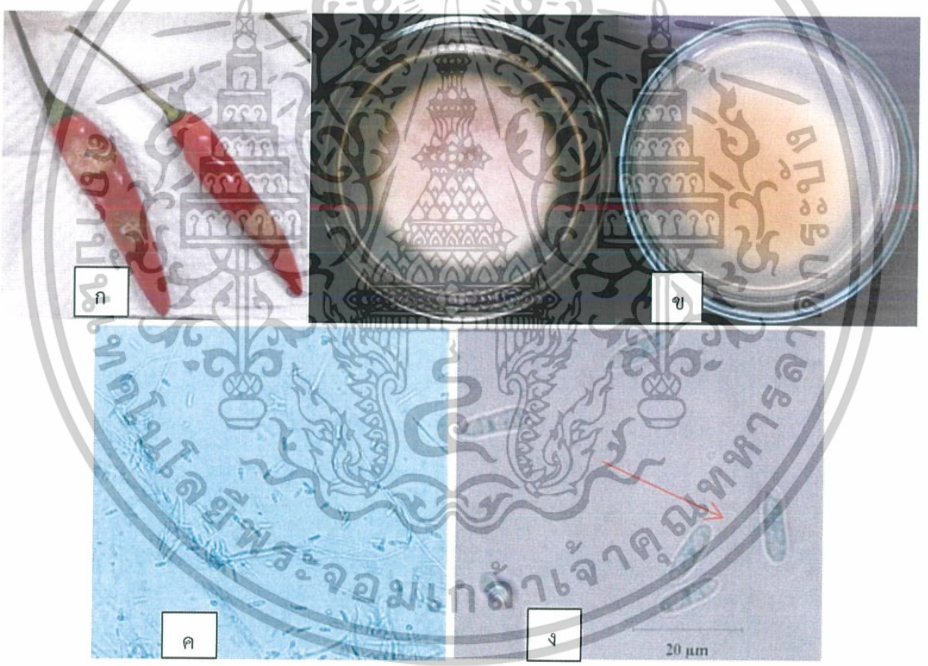
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญ ของราได้ดีบนจานเพาะเชื้อ คือ ร้อยละ 85.84 โดยใชเซลลยีสตปริมาณ 5×10^{6}เซลล์/มิลลิลิตร เนื่องจากในงานวิจัยนี้สามารถระบุความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ได้ชัดเจน ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

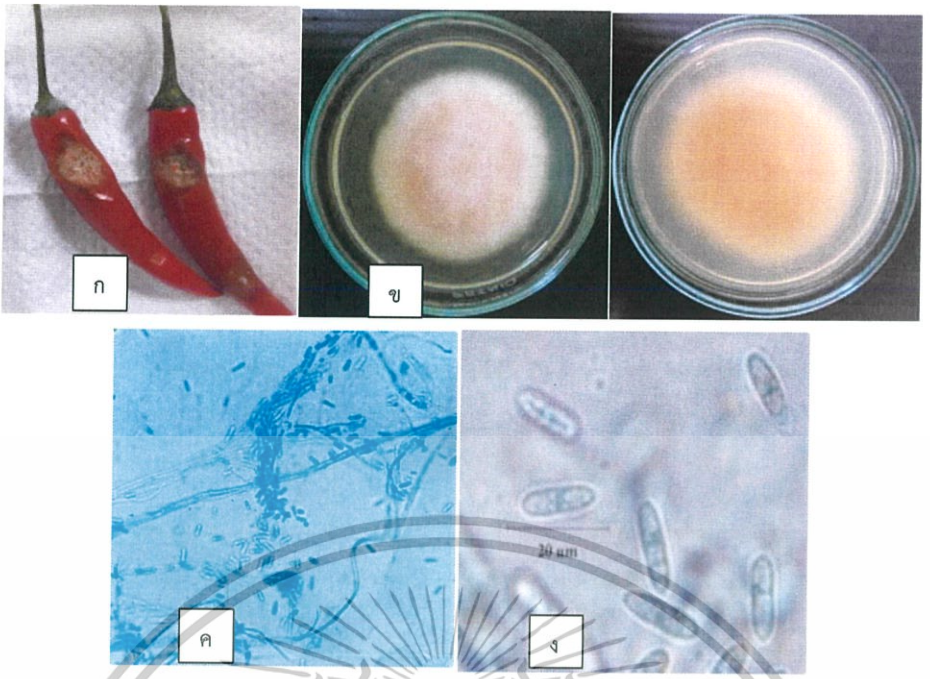
4.5 การระบุสายพันธุ์เชื้อราและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

จากการนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลทมาระบุสายพันธุ์ โดยนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับแหล่งข้อมูลของ B.S. Weir et al. (2012) ที่ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 7 วัน รูปร่างโคนิเดีย การสร้างหรือไม่สร้าง setae จากการศึกษาพบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีแผลที่เกิดบนผิวพริกรูปร่างวงรีค่อนไปทางกลม แผลยุบตัวขยายเป็นวงกว้าง เมื่อแผลแก่สปอร์จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงไม่พบ setae โคนิเดียรูปร่างทรงรี หัวท้ายมน จึงสามารถระบุได้ว่า เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท นี้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ *Colletotrichum gloeosporioides.* และกำหนดให้ รหัส KM01 แทนเชื้อรา *C. gloeosporioides* 01 และเชื้อรา รหัส RM02 แทนเชื้อรา *C. gloeosporioides* 02



รูปที่ 4.11 ผลการทดลองการก่อโรคในพริกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* 01 (ก) แผลบนพริกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* 01 สาเหตุโรคแอนแทรคโนส (ข) ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* 01 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ที่ 7 วัน ซ้ายด้านหน้าและขวาด้านหลัง (ค) ลักษณะสปอร์และเส้นใย ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 40x (ง) โคนิเดียของสปอร์รูปร่างทรงรีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง100x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลการทดลองการก่อโรคในพริกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 02 (ก)แผลบนพริกจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* 02 สาเหตุโรคแอนแทรคโนส (ข)ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides*02 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ที่ 7 วัน ซ้ายด้านหน้าและขวาด้านหลัง (ค)ลักษณะสปอร์และเส้นใย ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 40x (ง) โคนิเดียของสปอร์รูปร่างทรงรีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 100x

Kim et al. (2004) ในประเทศเกาหลีพบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้างความเสียหายต่อพริกมากที่สุดในเชิงพาณิชย์ เพราะเชื้อรานี้จะทำลายระยะการเจริญเติบโตของพริก โดยเม็ดพริกจะพบเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบและลำต้นถูกทำลายด้วยเชื้อรา *C. coccoides* และ *C. dematium*. และระบุสายพันธุ์ว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธีเดียวกันกับการจำแนกของ Sutton (1980) และพรพิมล (2555) ที่ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนี รูปร่างโคนิเดีย และ การสร้าง หรือไม่สร้าง setae ผลการทดลอง คือ *C. gloeosporioides* เป็นรา *Glomerella cingulate* ระยะ teleomorph สร้างโคนิเดีย รูปทรงกระบอก หัวท้ายมนไม่มี setae ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับการทดลองครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการทดสอบการควบคุมทางชีวภาพบนพริก

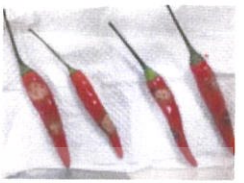
ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)
	Chamber1	Chamber2	Chamber3		
Control	0 %	0 %	0 %	0 %	±0
แบคทีเรียนไอโซเลท A4	62.5 %	62.5 %	87.5 %	70.83 %	±14.43
ยีสต์ไอโซเลท A35	50 %	75 %	62.5 %	62.50 %	±12.5

ตารางแสดงผลการทดสอบลงบนตัวอย่างพริกในแต่ละกล่องบ่มชื้น เพื่อหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในผลพริก

	จำนวนความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นการยับยั้ง	รูปภาพการทดสอบลงบนพริก
Control	0/24	0 %	
แบคทีเรียไอโซเลทที่ A4	17/24	70.83±14.43 %	
ยีสต์ไอโซเลทที่ A35	15/24	62.50 ± 12.5 %	

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนพริก โดยการนำเชื้อก่อโรค 2 ชนิดที่ได้มา คือ KM01 และ RM02 นำมาผสมกันเป็นเชื้อผสม และทดสอบลงบนพริกโดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้เตรียมไว้คือ A4 และ A35 และมีการทดสอบโดยมีชุดควบคุม 1 ชุดโดยใช้น้ำกลั่นรวมกับเชื้อผสม พบว่าในชุดควบคุมนั้นมีการเกิดโรค 100 % ผลการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ A4 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 15 จาก 24 แผล บนผลพริกคิดเป็นร้อยละ 70.83 และผลการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ A35 พบว่าสามารถยับยั้งการก่อโรคได้ 13 จาก 24 แผล บนผลพริกคิดเป็นร้อยละ 62.50 สังเกตว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ A4 ที่เป็นแบคทีเรียจะมีความสามารถในการยับยั้งมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ A35 ที่เป็นยีสต์ 8.33 %

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีหลายแบบอย่างเช่น Luis (2018) ทำการทดสอบการยับยั้ง *C. gloeosporioides* เกิดจากกลไกการทำงานของแอนติเจนที่แตกต่างกันโดยใช้ยีสต์ *D. hansenii* โดยทำการทดสอบในมะละกอ เพื่อดูประสิทธิภาพการยับยั้งราด้วยยีสต์ *D. hansenii* การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร จะใช้สารประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตมาจากยีสต์ *D. hansenii* ซึ่งความเข้มข้นของ ยีสต์ *D. hansenii* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ และความเข้มข้นของยีสต์ที่สูงขึ้นสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยเทียบผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 และ ยีสต์ไอโซเลทที่ A35 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้โดยการทดสอบได้ผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 78.50 และ 62.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งถือว่าแบคทีเรียไอโซเลท A4 และ ยีสต์ไอโซเลท A35 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลอง การควบคุมโรคแอนแทรคโนสทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่า

(1) การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 50 ไอโซเลท จาก 10 ตลาด พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดีที่สุด 2 ไอโซเลท คือ A4 และ A35

(2) เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า A4 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปล่างเป็นท่อนสั้น และ A35 เป็นยีสต์ เซลล์เดียว มีรูปร่างกลม

(3) ระบุชนิดเชื้อราจากการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทนี้เป็นชนิดเดียวกัน คือ *C. gloeosporioides* จึงกำหนดรหัสไอโซเลท KM01 คือ *C. gloeosporioides* 01 และ ไอโซเลท RM02 คือ *C. gloeosporioides* 02

(4) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* 01 ด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 และ ยีสต์ไอโซเลทที่ A35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งร้อยละ 39 และ 36 ตามลำดับ ส่วน *C. gloeosporioides* 02 ประสิทธิภาพในการยับยั้งร้อยละ 44 และ 38 ตามลำดับ

(5) การทดสอบการเกิดโรคซ้ำบนเม็ดพริกโดยทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ A4 และ ยีสต์ไอโซเลทที่ A35 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ผลร้อยละ 70.83 และ 62.50 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากพริกเป็นพืชทางเศรษฐกิจ และสามารถทำรายได้มูลค่ามากให้กับเกษตรกร แต่ปัญหาการเกิดโรคของพริกก็ยังร้ายแรงอยู่เช่นกัน ซึ่งในงานวิจัยนี้เราหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มาควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริก นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้ เช่น

(1) ศึกษาปริมาณของสาร ชนิดของสารหรือเอนไซม์ที่พบในเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ รวมถึงกลไกการยับยั้งที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดในพริกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) ศึกษาโรคและสาเหตุการเกิดโรคที่มาจากเชื้อรา ยีสต์ หรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจก่อให้เกิดโรคในพริก

(3) ในการทดสอบการควบคุมโรคบนพริก นอกจากวิธี Koch's pastulate สามารถใช้การระเหยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ้างอิง

กรวีร์ ชูธรรมธัช. (2553). สารานุกรมไทยฉบับเยาวชน เล่ม 7 กรุงเทพฯ : โครงการสารานุกรมไทยสำหรับ

เยาวชนโดยพระราชประสงค์พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, 90,110-119

นิพนธ์ ทวีชัย. (2553). โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนโดยในพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว กรุงเทพฯ : โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนโดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว, 35,129-159.

บรรพต ณ ป้อมเพชร. (2555). การควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี. เอกสารพิเศษ ฉบับที่ 5. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.,202.

พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสะอาด. (2554). การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุของโรคพืชโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ดร. วีระณีย์ ทองศรี. (2012). การควบคุมโรคของไม้ผลก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/2012/07/125/ สืบค้นเมื่อวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ.2562

ละออ ชมพักตร์. (2552) หลักการเกิดโรคติดเชื้อ (Principle of infection) ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ลักษณา วรรณภีร์ . (2536). การผลิตการตลาดพริก : โรคแมลงศัตรูพริกและการป้องกัน กรมวิชาการเกษตรและส่งเสริมการเกษตร

สมเกียรติ ศิริรัตนพฤกษ์. (2553). คู่มือเกษตรปลอดโรคสำหรับเกษตรกรแลอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.,7-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สงพงค์ สิงค์บัญหา, ณัฐฐา โพธิ์ฐาพร,ประสาทพร สมิทนามา. Anthracnose Disease of Strawberry and Use of Antagonistic Microorganism for Disease Prevention. 2014; 19(3) : 371-384

สมปอง ทองดีแท้. (2536). ผลกระทบและพิษภัยจากการใช้วัตถุมีพิษทางการเกษตร. น. 286-293. ในเกษตรยั่งยืน : อนาคตของเกษตรไทย. เอกสารวิชาการประจำปี 2536. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร และจิราภา จอมไธสง กรมวิชาการเกษตร. (2561). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:https://www.kehakaset.com/articles_details.php?view_item= 664 สืบค้นเมื่อวันที่ 20 เมษายน 2562

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ .(2552). การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพริกชี้ฟ้า (*Collectotrichum gloeosporioides*) โดยยีสต์ที่แยกได้จากผักและผลไม้ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

อุดม ฟ้ารุ่งสาง. (2561). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.thaikasetsart.com/โรคของพริกประเทศไทย สืบค้นเมื่อวันที่ 20 เมษายน 2562

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeasts strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). Biological Control 42: 326-335.

Fu, G.; Huang, S.; Ye, Y.; Wu, Y.; Cen, Z.; Lin, S. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. Biological Control 2010, 55, 1–10.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Ninth Edition). Williams & Wilkins. Baltimore.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim KK, Yoon JB, Park HG, Park EW, Kim YH. 2004. Structural modifications and programmed cell death of chilli pepper fruits related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. Genetic and Resistance94:1295-1304.

Lima G., A. Ippolito, A. Nigro and M. Salerno. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans*. and *Candida oleophila*. against postharvest strawberry rots. Postharvest Biology and Technology 10: 169-178.

Luis G. Hernandez-Montiel. 2018 Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii*. in biological Control of antracnose on papaya fruit. Veracruzana University.

Skidmore, A.M. and C.H., Dickinson. (1976). Colony interaction and hyphalinterference between Septoria nodorum and phyllop lane fungi. 66, 57-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหาร

1. PDA (Potato dextrose agar)

Potato dextrose broth	24	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

2. PDB (Potato dextrose Broth)

Potato dextrose broth	0.48	กรัม
Distilled water	20	มิลลิลิตร

3. NB (Nutrient Broth)

Nutrient Broth	0.14	มิลลิกรัม
Distilled water	20	มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี

1. Glycerol

วิธีการเตรียม Glycerol 15 % ปริมาตร 100 ml

1. Glycerol	15	ml.
2. น้ำกลั่น	85	ml.

2. Tween 20

วิธีการเตรียม Tween 20 1% ปริมาตร 100 ml.

1. Tween 20	1	ml.
2. น้ำกลั่น	99	ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้