บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างใบสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการของโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย สำหรับอาการของ**โรคใบจุดตานก** พบว่าลักษณะเป็นจุดกลม บริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาล หรือสีเทา ขอบแผลมีสีม่วงแดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล 4 – 6 มิลลิเมตร และได้ตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free Hand Section แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ conidia รูปทรงกระบอกไม่มีสี มี septate 0 – 3 อัน conidia เจริญอยู่บน conidiophore ขนาดสั้น ไม่มีสี ไม่แตกกิ่งก้าน และพบรอยที่เกิดจากการหลุดร่วงของสปอร์ ซึ่งใกล้เคียงกับลักษณะของ เชื้อรา *Ramularia tulasnei* Sacc. ที่ Maas (1998) ได้อธิบายไว้ เมื่อทำการแยกเชื้อราสาเหตุบริเวณแผลที่ใบโดยเลี้ยงลงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นพืชช้ามากใช้เวลา 10-12 วัน โคโลนีมีลักษณะกลมเจริญออกมาในแนวรัศมี สร้าง pigment สีแดงบนอาหาร PDA แต่ไม่มีการสร้างสปอร์ เมื่อนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 18 °C ในสภาพมืด พบว่าเชื้อรามีการสร้างสปอร์จำนวนมาก ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าที่ 18 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังที่ Elliott (1985) ได้กล่าวไว้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง สปอร์ของเชื้อรานี้อยู่ระหว่าง 18 - 24 °C เมื่อโคโลนีมีอายุตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป ส่วนอาการของ**โรคใบไหม้โฟมอพซิส** ในระยะแรกลักษณะเป็นจุดกลมสีม่วงแดง เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้น ขอบแผลมีสีแดงหรือสีเหลือง กลางแผลมีสีน้ำตาล พบโครงสร้าง pycnidia เป็นจำนวนมาก และเมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นจะพัฒนาเป็นรูปตัววี การตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยวิธี Free Hand Section แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบโครงสร้าง pycnidia ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบพืช รูปร่างกลมมีช่องเปิดโผล่พ้นผิวพืชออกมา เป็นไปตามที่ Maas (1998) ได้รายงานไว้ว่าโครงสร้าง pycnidia ของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh) มีรูปร่างกลมสีดำ ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบพืช conidia มีขนาด 5.5 – 7.5 x 1.5 – 2 ไมครอน ลักษณะเซลล์เดี่ยวไม่มีสี เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุบริเวณแผลที่ใบ โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA โคโลนีในระยะแรกมีสีขาว ลักษณะกลมเจริญออกมาในแนวรัศมี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีครีม เมื่ออายุ 21 วัน จะเริ่มพบโครงสร้าง pycnidia ปรากฏบนอาหาร ซึ่งจะพบมากในบริเวณที่ใกล้กับตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ การพบ pycnidia บน PDA จำนวนมาก เป็นไปในทำนองเดียวกับผลงานของ Maas (1998) ที่ได้รายงานไว้

ในการแยกราปฏิปักษ์จากดิน และแยกจุลินทรีย์จากใบสตรอเบอรี่ ได้นำตัวอย่างดินและใบสตรอเบอรี่จากแปลงปลูกของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

การแยกราปฏิปักษ์จากดินโดยวิธี Soil Dilution Plate พบเชื้อราจำนวน 38 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด พบราปฏิปักษ์ Trichoderma ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 8 ชนิดได้ดีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท CMU 2000-9 , CMU 2000-14 และ CMU 2000-16 ทำการจัดจำแนกชนิดโดยใช้วิธีการจำแนก (key) ของ Domsch และ Game (1980) พบว่าเป็น *Trichoderma viride* , *T. harzianum* และ *T. hamatum* ตามลำดับ สำหรับการ **จุลินทรีย์จากผิวใบสตรอเบอรี่**โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร NA พบเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ จำนวน 18 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis obscurans* พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท CMU b 2000–1 และไอโซเลท CMU b 2000–6 จึงนำแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มาศึกษา โดยเลี้ยงบนอาหาร NA พบว่าทั้งสองไอโซเลท มีลักษณะเหมือนกันคือ มีโคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอน ขอบของโคโลนีมีลักษณะหยัก เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมสีด้วยวิธีแกรม พบว่าเป็นแกรมบวก และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์ลักษณะเป็นท่อน ขนาดประมาณ 1.0 – 1.2 x 3.0 – 3.5 ไมครอน รูปร่างเป็นเปลี่ยมหัวท้ายตัด เรียงต่อกัน

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. tulasnei* สาเหตุโรคใบจุดตานก โดยวิธี Dual Culture พบว่าราปฏิปักษ์ *T. viride* (ไอโซเลท CMU 2000 – 9) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด คือ 39.15% แตกต่างทางสถิติกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดเดียวกันนี้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. obscurans* สาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิส โดยวิธีที่กล่าวมาแล้ว พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ ได้ดีที่สุดคือ 54.84 % แตกต่างทางสถิติกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่น ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าโรคใบจุดตานก

สำหรับการทดสอบ การเป็นปฏิปักษ์ของรา *T. viride* พบว่ามีการแข่งขันและการทำลายเส้นใยของราสาเหตุโรคพืช โดยพบว่าราปฏิปักษ์มีการเจริญเร็วกว่าราสาเหตุ บางไอโซเลทมีการเจริญเร็วมากจนคลุมทับเส้นใยของราสาเหตุ ทำให้โคโลนีของเชื้อราสาเหตุยุบตัวลง ในการเป็นราปฏิปักษ์นั้น จิระเดช และวรรณวิไล (2542) กล่าวไว้ว่า เชื้อรา Trichoderma มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อโรคอยู่ 3 ประการคือ การแข่งขันกับเชื้อโรค การเป็นปรสิต และการสร้างปฏิชีวนะสารเพื่อหยุดยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สาเหตุของการแฟบของเส้นใยอาจจะ

มาจากการสูญเสียของเหลวภายในเส้นใยจากการดูดกินของราปฏิปักษ์ หรืออาจเกิดจากสารบางอย่างที่ราปฏิปักษ์สร้างขึ้นเพื่อทำลายราสาเหตุก็ได้

จากการศึกษาวิธีการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโดยเชื้อราปฏิปักษ์ ด้วยวิธี Dual Slide Culture และ Vernal Slide Culture ได้ผลตรงกันคือ พบเส้นใยของราปฏิปักษ์ *T. viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9) สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *R. tulasnei* และเชื้อรา *P. obscurans* ซึ่งทำให้เส้นใยของราสาเหตุแฟบลงในเวลาต่อมา จากการสังเกตุพบว่า เส้นใยของราปฏิปักษ์ติดสีเข้มมองเห็นชัดเจนในขณะที่เส้นใยราสาเหตุมีขนาดใหญ่กว่ามากแต่สีจาง อาจเป็นเพราะว่าของเหลวที่อยู่ภายในของราสาเหตุถูกดูดซับโดยเส้นใยของราปฏิปักษ์ สำหรับการเหี่ยวแฟบของเส้นใยอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ β - 1 , 3 glucan chitinase และ protease ดังที่ Ridout และคณะ (1988) ได้กล่าวว่าเชื้อรา *T. viride* เป็นปรสิตกับเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว สลายผนังเซลล์และแทงเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อรา *R. solani*

จากการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ สารชีวภัณฑ์ชื่อการค้า Larminar (*Bacillus subtilis*) และสารเคมีชื่อการค้า Antracol (propineb) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดตานก ในสภาพเรือนทดลองโดยการฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และหลังฉีดพ่นซ้ำอีก 4 ครั้งทุก 5 วันหลังฉีดพ่นครั้งแรก ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดระดับการเกิดโรคได้ในทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว) โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคได้ดีคือ *T. viride* (ไอโซเลท CMU2000–9) และ *T. harzianum* (ไอโซเลท CMU2000–14) โดยลดจำนวนใบที่เป็นโรคได้ร้อยละ 29.93 และ 27.52 ตามลำดับ ส่วน Larminar ลดได้เพียงร้อยละ 10.01 เมื่อเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อรา Antracol แล้ว ราปฏิปักษ์ยังลดได้น้อยมาก เพราะ Antracol ลดจำนวนใบที่เป็นโรคได้ถึงร้อยละ 91.26 และเมื่อวัดผลโดยดูจากเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย ถึงแม้ว่าจะเป็นไปในทำนองเดียวกัน แต่ *T. viride* และ *T. harzianum* สามารถลดเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายของโรคใบจุดตานกได้ถึง 53.23 เปอร์เซ็นต์ และ 52.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Larminar สามารถลดได้เพียง 22.27 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Antracol สามารถลดเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายได้สูงกว่า คือได้ 88.88 เปอร์เซ็นต์

ในการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ Larminar และ Antracol ในการควบคุมโรคใบไหม้โฟมอพซิส ในสภาพเรือนทดลองโดยวิธีการเดียวกับที่กระทำกับโรคใบจุดตานก ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดจำนวนใบที่เป็นโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยพบว่า *T. viride* และ แบคทีเรีย CMU b2000-6 สามารถลดจำนวนใบที่เป็นโรคได้ร้อยละ 67.03 และ 63.23 ตามลำดับ ส่วน Larminar ลดได้ค่อนข้างมากเช่นกันคือร้อยละ 51.20

ในขณะที่ Antracol สามารถลดได้สูงกว่า Trichoderma ทั้งสองชนิดไม่มากนัก คือได้ร้อยละ 81.31 และเมื่อวัดผลโดยใช้เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายพบว่า *T. harzianum* และ *T. viride* สามารถลดเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายลงได้ 59.72 เปอร์เซ็นต์ และ 57.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Larminar ลดได้เพียง 27.26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Antracol สามารถลดเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายได้สูงกว่า Trichoderma ทั้งสองชนิด คือลดได้ 71.59 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และ Larminar ในการควบคุมโรคใบไหม้โฟมอพซิสในสภาพแปลงทดลอง ทำการฉีดพ่นหลังจากสตรอเบอรี่มีอายุได้ 1 เดือน โดยมิได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ ทำการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสัปดาห์จำนวน 8 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีที่ทดสอบให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม อย่างไรก็ดี Sutton และ Peng (1993) ได้รายงานไว้ว่า ในการควบคุมโรคทางใบของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ในสภาพโรงเรือน พบว่า *T. viride* , *Gliocladium roseum* และ *Penicillium* sp. สามารถลดปริมาณการสร้าง conidiophore ของเชื้อได้ 97-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Tronsmo และ Raa (1977) ยังได้ทำการควบคุมโรคเน่าแห้งของแอปเปิลที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* โดยใช้ราปฏิปักษ์ *Trichoderma pseudokiningii* พบว่าในสภาพโรงเรือนที่ควบคุมสภาพแวดล้อม *T. pseudokonigii* สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ แต่เมื่อนำไปทดสอบในสวนผลไม้ พบว่าราปฏิปักษ์นี้ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูกพืชมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมบนผิวใบพืช อุณหภูมิในอากาศ ความชื้นในดิน รวมถึงไม่ได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ อาศัยปริมาณเชื้อสาเหตุที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งอาจจะไม่สม่ำเสมอในแต่ละกรรมวิธี หรืออาจเกิดจากประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วในสภาพธรรมชาติ ทำให้ขาดคุณสมบัติในการใช้อาหารและพื้นที่ผิว จึงไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ (Hsu และคณะ 1992) หรืออาจเกิดเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สูญเสียความสามารถ ในการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ผ่านการคัดเลือกมาจากสภาพห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาทดสอบในแปลงปลูกไม่สามารถปรับตัวและดำเนินกิจกรรมต่างๆ ได้ ดังที่ กาญจนา (2542) ได้รายงานถึงการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากแปลงปลูก พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ในสภาพเรือนทดลอง แต่ในสภาพแปลงทดลอง พบว่าสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น