# การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบมะเขือเทศในการควบคุมเชื้อรา *Stemphylium* sp. สาเหตุโรคใบจุดสีเทา

# Screening of Phylloplane Bacteria from Tomato Leaves to Control *Stemphylium* sp., a Causal Agent of Gray Leaf Spot Disease

วราภรณ์ สุทธิสา* และ ปพิชญา นามแสง

Waraporn Sutthisa* and Papitchaya Namsang

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*

*Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University*

Received : 11 June 2017

Accepted : 6 July 2017

Published online : 12 July 2017

## บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Stemphylium* sp. สาเหตุโรคใบจุดสีเทาของมะเขือเทศ โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบมะเขือเทศ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 46 ไอโซเลต จากวิธีการล้างใบ 40 ไอโซเลต และวิธีการ leaf printing 6 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Stemphylium* sp. บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี dual culture สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium* sp. ได้ 6 ไอโซเลต โดย %การยับยั้งระหว่าง 47.43 - 58.36 % เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีเทาด้วยวิธีการ detached leaf พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดแผลดีที่สุด คือ ไอโซเลต PDN15 สามารถลดขนาดแผลได้ 78.50 % เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการใช้แบคทีเรีย การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า PDN15 คือ *Bacillus* sp.

**คำสำคัญ** : เชื้อรา *Stemphylium* sp. ผิวใบ โรคใบจุดสีเทา

*Corresponding author. E-mail : wsutthisa@gmail.com

## Abstract

This research aims to screening phylloplane bacteria from tomato leaves to control *Stemphylium* sp., a causal agent of gray leaf spot disease. Forty six isolates were obtained including 40 isolates via leaf washing and 6 isolates via leaf printing technique. All of isolates were tested *in vitro* for growth inhibitory effect against *Stemphylium* sp. on potato dextrose agar (PDA) using dual culture technique. Among these phylloplane bacteria, 6 isolates demonstrated inhibitory effect against the growth of *Stemphylium* sp. with % inhibition in range of 47.43-58.36%. Then, the six potent bacteria were tested for the efficacy to control gray leaf spot disease by detached leaf technique. The result showed that PDN15 was the most effective to reduce the lesion sizes by 78.50% as compared to non-bacteria treated. Base on morphological and biochemical testing, PDN15 was identified as *Bacillus* sp.

**Keywords** : *Stemphylium* sp., phylloplane, gray leaf spot disease

**บทนำ**

มะเขือเทศเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศไทย นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลกมาเป็นเวลานาน นำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในรูปของมะเขือเทศบริโภคสด (table tomato) เพื่อการบริโภค แล้วยังสามารถส่งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูป (processing tomato) ได้หลายอย่าง เช่น การผลิตซอสมะเขือเทศ (Tomato ketchup) การผลิตมะเขือเทศในประเทศไทยส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรมักจะประสบปัญหาเกี่ยวกับศัตรูไม่ว่าจะเป็นวัชพืช ซึ่งจะแก่งแย่งน้ำ ธาตุอาหาร แสงแดด และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้คุณภาพและผลผลิตตกต่ำ บางชนิดเป็นที่อยู่อาศัยของแมลง ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายได้ทั้งกับใบและผล ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมะเขือเทศลดลงเป็นจำนวนมาก หากไม่มีการจัดการเรื่องการเขตกรรมตั้งแต่แรกให้ดีก็จะมีปัญหาตามมาภายหลัง เช่น มีวัชพืชขึ้นอย่างรวดเร็ว มีโรคและแมลงระบาดทำความเสียหายให้กับผลิตผล ทำให้ได้ผลิตผลที่มีคุณภาพไม่ดี ผลผลิตต่อไร่ต่ำ (Jareanruk, 2007) โดยเฉพาะโรคใบจุดสีเทา (Gray leaf spot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. นั้นเป็นอีกโรคหนึ่งที่พบการระบาดได้ทั่วไป สามารถเกิดกับมะเขือเทศได้ทุกสายพันธุ์ โดยจะพบบริเวณใบล่างมากกว่าใบยอด อาการขั้นต้นจะปรากฏเห็นจุดสีน้ำตาลอมดำขนาดเล็กบนใบต่อมาจะกลายเป็นสีเทา (Nasehi *et al.*, 2012) เนื้อใบยุบตัว รูปร่างไม่แน่นอน แผลด้านใต้ใบและหลังใบมีขนาดเท่ากัน และกระจายทั่วใบมะเขือเทศ บางสายพันธุ์มีความอ่อนแอต่อโรคมากทำให้พบอาการโรคบริเวณใบยอดด้วย โดยเฉพาะมะเขือเทศผลเล็ก (cherry indeterminate type) เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์มักพบเชื้อราอยู่บนแผลโดยเห็นเป็นสปอร์สีน้ำตาลเข้ม มีหลายเซลล์รูปร่างคล้ายลูกระเบิด ติดอยู่บนก้านชูสปอร์สีน้ำตาลเข้ม (Thummabenjapone & Phola, 2007) ในปัจจุบันมีการตื่นตัวในการลดการใช้สารเคมีกันมากขึ้น เนื่องจากผู้ผลิตและผู้บริโภคเริ่มตระหนักถึงพิษภัยที่เกิดจากสารเคมีตกค้างในผลิตผลและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการกีดกันทางการค้าจากประเทศคู่ค้า โดยอ้างถึงผลผลิตที่มีสารเคมีตกค้าง ทำให้การปลูกพืชในระบบต่างๆ ที่ใช้สารเคมีน้อยจนถึงไม่ใช้เลยเป็นที่นิยมปฏิบัติมากขึ้น เช่น การผลิตพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ และนิยมปฏิบัติกันอย่างกว้างขวาง ดังเช่น Montesines *et al.*, 1996 ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia*

*herbicola* และ *Pseudomonas fluorescens* จากส่วนเหนือดินของพืช และรากพืชหลายชนิด พบว่ามีเพียง 7% ที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* ได้ และมีเพียง 4 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบจุดสีน้ำตาลของแพร์เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ detached leaf ในขณะที่ Hussien *et al.*, 2007 ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการควบคุมโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* บนต้นหอม การทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า *P. fluorescens*, *B. subtilis* และ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *S. vesicarium* ได้ดีที่สุด ส่วน Nainwal & Vishunavat, 2016 ศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารเคมีและการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria porri* และโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* บนต้นหอม พบความรุนแรงของโรคต่ำสุดเมื่อฉีดพ่นด้วยแมนโคเซ็บ (3%) ร่วมกับ โมโนคลอโตฟอส (0.05%) โดยพบความรุนแรงของการเกิดโรค 2.67% และ 2.57% ตามลำดับ เมื่อฉีดพ่นด้วยสารสกัดสะเดา (0.3%) พบความรุนแรงของการเกิดโรค 5.57% และ 4.78% ตามลำดับ ในขณะที่การฉีดพ่นด้วย *T. harzianum* (1%) พบความรุนแรงของการเกิดโรค 15.44% และ 13.11% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากผิวใบมะเขือเทศมาใช้ในการควบคุมโรคใบจุดสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. ทดแทนการใช้สารเคมี เพื่อให้มีความปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

**วิธีดำเนินการวิจัย**

**การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบมะเขือเทศ**

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบมะเขือเทศสีดา จำนวน 15 ใบ ด้วย 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีการล้างใบมะเขือเทศ โดยนำใบมะเขือเทศล้างผ่านน้ำไหล 1-2 นาที จากนั้นนำมาล้างน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร ใส่ลงไปใน flask ที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อัตราส่วนของใบ 1 กรัม ต่อน้ำปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้ผิวใบสัมผัสกับน้ำแล้วทำให้เจือจางที่ความเข้มข้น $10^{-1}$ ถึง $10^{-3}$ เท่า แล้วดูดมา 0.1 มิลลิลิตร นำไปหยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร potato dextrose agar (PDA), nutrient agar (NA), yeast malt medium (YM) และ arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) บ่มเชื้อไว้ 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์ และวิธี leaf printing ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อใบมะเขือเทศเบื้องต้นเช่นเดียวกับกรรมวิธีล้างใบ แล้วนำมากดลงบนผิวหน้าอาหาร PDA และนำใบมะเขือเทศออก บ่มเชื้อไว้ 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

**การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Stemphylium* sp. ของแบคทีเรีย**

**การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธีการ dual culture**

เลี้ยงเชื้อรา *Stemphylium* sp. สาเหตุโรคใบจุดสีเทา ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ก่อน (เนื่องจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. มีอัตราการเจริญช้า) แล้วทำการปลูก

เชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เข็มเขี่ยแตะเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 - 48 ชั่วโมง มาแตะบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *Stemphylium* sp. ไว้แล้ว 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท ส่วนในกรรมวิธีควบคุม ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้อง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเชื้อราทุกวันจนกระทั่งเชื้อรา *Stemphylium* sp. ในจานควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Stemphylium* sp. โดยหา %การยับยั้งจากความสัมพันธ์ต่อไปนี้ (Sutthisa, 2002)

%การยับยั้งการเจริญโดยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ = 100 – [(Dt x 100)/Dc] (1)

เมื่อ Dt = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *Stemphylium* sp. ในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบ
Dc = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *Stemphylium* sp. ในจานเลี้ยงเชื้อควบคุม

**การทดสอบการควบคุมโรคบนผิวใบมะเขือเทศด้วยวิธี Detached leaf**

เตรียมใบมะเขือเทศปกติที่ไม่มีอาการของโรค ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวใบโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนผึ่งให้แห้ง แล้วหุ้มก้านใบด้วยสำลีชุบน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ทำแผลบนใบมะเขือเทศด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ และเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นกวาดเซลล์ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเตรียมเซลล์แขวนลอย ปรับความเข้มข้นให้ได้ $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วย haemacytometer เตรียมเชื้อ *Stemphylium* sp. โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน แบ่งการทดลองเป็น 2 กรรมวิธี กรรมวิธีที่ 1 ใช้ cork borer ตัดชิ้นวุ้นของ *Stemphylium* sp. วางลงบนแผลบนใบก่อน หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นำชิ้นวุ้นออกจากใบมะเขือเทศ แล้วหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไป กรรมวิธีที่ 2 หยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผลก่อน หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงวางชิ้นวุ้นของ *Stemphylium* sp. ที่ตัดด้วย cork borer ทับลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำชิ้นวุ้นออก ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ กรรมวิธีควบคุม คือหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 25 ไมโครลิตร แทนเชื้อแบคทีเรียทดสอบ บ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกันหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน หา %การยับยั้งการเกิดแผล ดังนี้ (Sutthisa, 2002)

% การยับยั้งการเกิดแผล = 100 – [(Lt x 100)/Lc] (2)

เมื่อ Lt = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลบนใบทดสอบ
Lc = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลในกรรมวิธีการควบคุม

**การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีเทา**

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร NA สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาลักษณะและรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมแกรม และการย้อมสปอร์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Sutthisa, 2002)

**ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล**

**การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวใบมะเขือเทศ**

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากใบมะเขือเทศโดยใช้วิธีการล้างใบและ leaf printing สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลต จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยเป็นเชื้อจากกรรมวิธีล้างใบ 40 ไอโซเลต และจากวิธี leaf printing 6 ไอโซเลต ซึ่งวิธี leaf printing พบโคโลนีของเชื้อราเจริญขึ้นมามากกว่าแบคทีเรีย และเชื้อรายังเจริญคลุมทับโคโลนีแบคทีเรียด้วย เนื่องจากไม่ได้เติมสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเลือกใช้อาหาร 4 ชนิดในการแยกเชื้อเพื่อให้ได้กลุ่มเชื้อที่มีความหลากหลาย บนอาหารแต่ละชนิดมีจุลินทรีย์ที่มีลักษณะต่างๆ กัน เจริญขึ้นมาให้เห็นโดยพบว่าบนอาหาร NA และ PDA มีจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีหลากหลายและมีปริมาณมากที่สุดเพราะเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อทั่วไป (general propose media) ส่วนบนอาหาร AGMA และ YM ที่ใช้สำหรับแยก Actinomycestes และยีสต์ พบการเจริญของแบคทีเรียน้อยและมีการเจริญช้า เพราะองค์ประกอบของอาหารที่มีแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อเชื้อมีปริมาณน้อย (Inwang, 1987)

**การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Stemphylium* sp. ของแบคทีเรีย**

**การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธีการ dual culture**

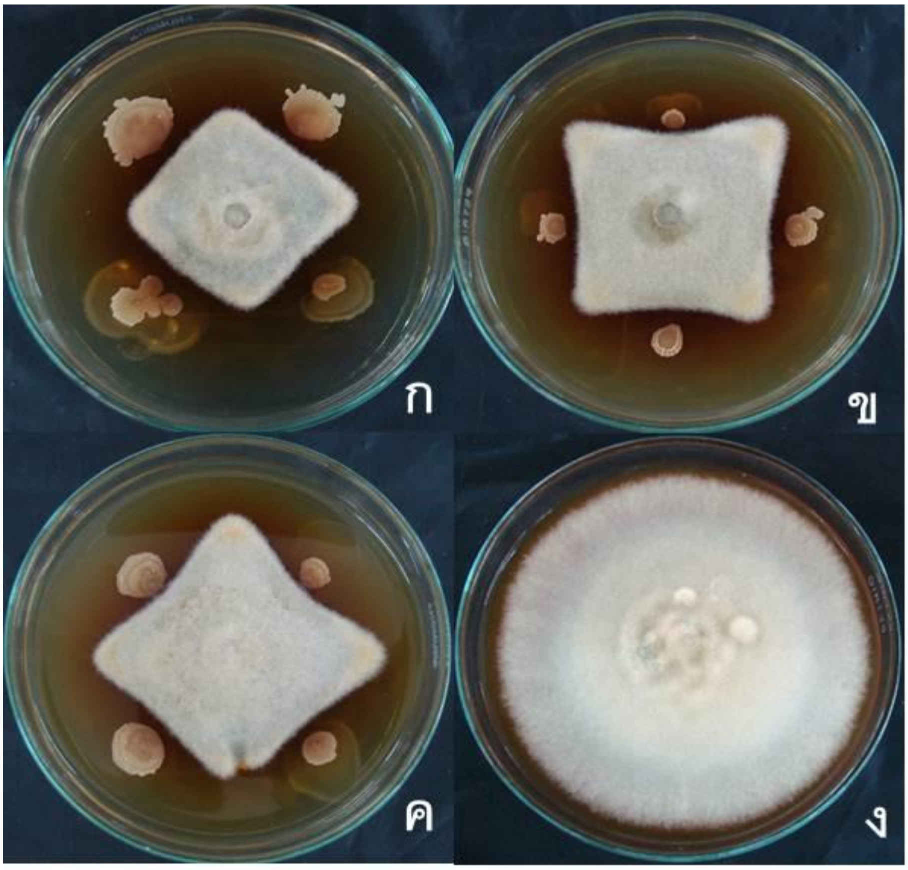
การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบมะเขือเทศทั้งหมด 46 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Stemphylium* sp. บนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture พบว่าทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium* sp. ได้ โดยมี %การยับยั้งระหว่าง 4.87-58.36% (ตารางที่ 1) ไอโซเลตที่ยับยั้งได้ดีที่สุด 6 ไอโซเลต คือ PDN12, PDN19, PDN15, NKN2, NKN5 และ YKR16 มี %การยับยั้งเท่ากับ 58.36%, 57.78%, 57.52%, 52.10%, 50.18% และ 47.43% ตามลำดับ จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Stemphylium* sp. ในจานอาหารที่ทดสอบร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย พบบริเวณยับยั้ง (inhibition zone หรือ clear zone) ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้ง (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Montesinos *et al*. (1996) โดยศึกษาเชื้อ *Erwinia herbicola* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งแยกจากพืช และรากของพืชหลายสายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดีย และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* โดยผลิตสารปฏิชีวนะต้านเชื้อรา *S. vesicarium* และ Ajilogba *et al*., 2013 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* และ *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่า *B. amyloliquefaciens* ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* ได้ดีที่สุด คือ 95.2% เมื่อทดสอบบนพืชพบว่า *B. cereus* มีการเกิดโรคโรคเหี่ยวน้อยที่สุดเพียง 18.75%

***ตารางที่ 1*** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบมะเขือเทศในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium* sp. ด้วยวิธีการ dual culture หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน

| **ไอโซเลต** | **การยับยั้ง (%)** [1/] | **ไอโซเลต** | **การยับยั้ง (%)** [1/] |
|---|---|---|---|
| NKR1 | 43.30 ± 0.95 [e] | AKN18 | 7.463 ± 0.63 [xy] |
| NKR2 | 35.58 ± 2.92 [gh] | AKN19 | 9.547 ± 1.28 [vw] |
| NKR3 | 27.32 ± 5.64 [k] | NDN1 | 30.16 ± 7.14 [j] |
| NKR4 | 20.65 ± 5.45 [mno] | NDN2 | 19.14 ± 7.52 [op] |
| NKR5 | 37.42 ±1.25 [g] | NDN3 | 33.33 ± 3.02 [i] |
| PKR7 | 35.58 ± 1.16 [gh] | NDN4 | 13.47 ± 1.01 [s] |
| PKR8 | 35.75 ± 0.73 [gh] | NDN5 | 16.06 ± 1.44 [r] |
| YKR14 | 36.42 ± 0.43 [g] | NDN6 | 4.87 ± 2.17 [z] |
| YKR16 | 47.43 ± 2.50 [d] | NDN7 | 33.49 ± 1.51 [i] |
| AKR17 | 37.42 ± 0.00 [g] | NDN8 | 11.55 ± 3.15 [tu] |
| NKN1 | 11.38 ± 0.43 [tuv] | NDN9 | 19.98 ± 8.06 [no] |
| NKN2 | 52.10 ± 3.23 [b] | NDN10 | 16.64 ± 9.54 [qr] |
| NKN3 | 34.49 ± 0.72 [hi] | NDN11 | 12.35 ± 1.32 [stu] |
| NKN4 | 19.40 ± 2.17 [op] | PDN12 | 58.36 ± 1.88 [a] |
| NKN5 | 50.18 ± 0.90 [c] | PDN13 | 5.714 ± 0.72 [yz] |
| NKN6 | 21.98 ± 5.06 [lm] | PDN14 | 10.97 ± 1.29 [uv] |
| NKN7 | 21.81 ± 1.88 [lmn] | PDN15 | 57.52 ± 5.11 [a] |
| NKN8 | 13.05 ± 1.61 [st] | PDN16 | 18.06 ± 5.91 [pq] |
| PKN9 | 9.047 ± 0.72 [wx] | PDN18 | 36.17 ± 0.00 [gh] |
| PKN10 | 19.98 ± 0.63 [no] | PDN19 | 57.78 ± 3.61 [a] |
| PKN15 | 21.98 ± 6.17 [lm] | PDN20 | 20.40 ± 2.14 [mno] |
| PKN16 | 17.22 ± 2.52 [qr] | YDN22 | 23.15 ± 0.00 [l] |
| PKN17 | 8.713 ± 1.88 [wx] | ADN24 | 39.34 ± 0.63 [f] |
| | CV[2/] (%) | | 3.12 |

[1/] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ % การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium* sp. จำนวน 3 ซ้ำ

[2/] Coefficient of variation

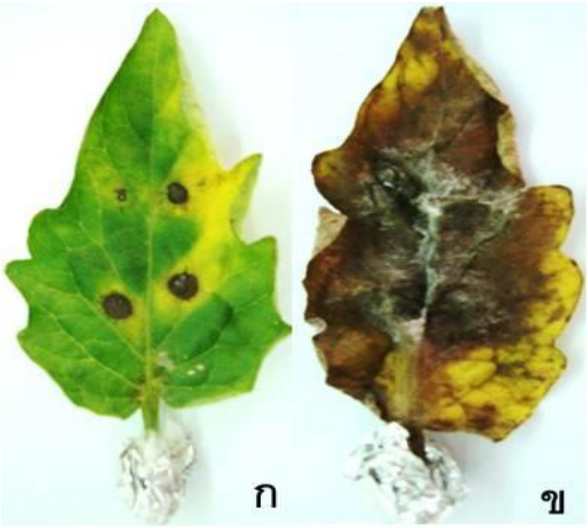



***ภาพที่ 1*** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบมะเขือเทศในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium* sp. ด้วยวิธีการ dual culture หลังปลูกเชื้อทดสอบ 4 วัน
ก. PDN12 ข. PDN15 ค. PDN19 ง. ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย

**การทดสอบการควบคุมโรคบนผิวใบมะเขือเทศด้วยวิธี Detached leaf**

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Stemphylium* sp. จำนวน 6 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดสีเทาของมะเขือเทศด้วยวิธี detached leaf โดยการปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp. ลงบนผิวใบก่อน แล้วจึงหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ พบว่าไอโซเลต PDN15 สามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ดีที่สุดถึง 78.50% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 2) แต่เมื่อทำการปลูกเชื้อ PDN15 ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp. กลับพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดแผลได้เพียง 35.81% นั่นอาจเป็นเพราะว่า PDN15 เหมาะกับการใช้ในการควบคุมโรคมากกว่าใช้ในการป้องกัน ซึ่งตรงข้ามกับไอโซเลต NKN2 พบว่า เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp. ก่อนปลูกเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดการเกิดแผลได้เพียง 2.56% ในขณะที่การปลูกเชื้อแบคทีเรียก่อน สามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ 41.29% นั่นแสดงว่า NKN2 เหมาะที่จะใช้ในการป้องกันการเกิดโรคมากกว่าใช้ในการควบคุมการเกิดโรค ส่วนไอโซเลตอื่นๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 2) ดังเช่นงานวิจัยของ Sutthisa *et al.*, 2014 ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

ของมะม่วงด้วยการใช้สารสกัดจากพืช พบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากข่าที่ความเข้มข้น 20,000 ppm ก่อนการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. 30 นาที สามารถยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรกโนสบนใบมะม่วงได้ 100% และ Sariah, 1994 ได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้ รวมทั้งทำให้เส้นใยมีรูปร่างที่ผิดปกติไป ซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียทำให้ลดการเข้าทำลายและลดจำนวนแผลที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *Pseudomonas fluorescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *S. vesicarium* สาเหตุโรคใบไหม้ในต้นหอมได้สูงที่สุด เมื่อศึกษาในหลอดทดลอง (Hussein *et al*., 2007)




***ภาพที่ 2*** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียไอโซเลต PDN15 ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. ด้วยวิธี detached leaf หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน

ก. หยดเชื้อ PDN15 หลังการปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp.

ข. หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหลังการปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp.

***ตารางที่ 2*** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียทดสอบในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. ด้วยวิธี detached leaf หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน

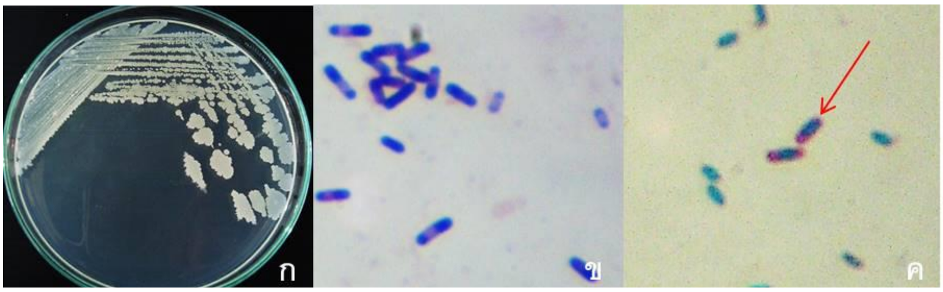
| **กรรมวิธี** | **ไอโซเลต** | **การยับยั้งการเกิดแผล (%)**[1/] |
|---|---|---|
| ปลูกเชื้อ *Stemphylium* sp. ก่อน 24 hr | YKR16 | 50.88 ± 2.31 [b] |
| | NKN2 | 2.56 ± 1.49 [h] |
| | NKN5 | 20.31 ± 2.74 [g] |
| | PDN12 | 43.98 ± 1.49 [c] |
| | PDN15 | 78.50 ± 2.39 [a] |
| | PDN19 | 24.26 ± 2.13 [f] |
| ปลูกเชื้อ *Stemphylium* sp. หลัง 24 hr | YKR16 | 43.78 ± 2.63 [c] |
| | NKN2 | 41.29 ± 2.63 [d] |
| | NKN5 | 26.36 ± 0.86 [f] |
| | PDN12 | 49.06 ± 2.30 [b] |
| | PDN15 | 35.81 ± 3.95 [e] |
| | PDN19 | 36.31 ± 2.63 [e] |
| CV[2/] (%) | | 2.321 |

[1/] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ % การยับยั้งการเกิดโรคใบจุดสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium* sp. จำนวน 3 ซ้ำ

[2/] Coefficient of variation

**การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีเทา**

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 6 ไอโซเลต พบว่าโคโลนีของแบคทีเรีย PDN15 ที่เจริญบนอาหาร NA มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีแห้ง เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น และสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (ภาพที่ 3) สามารถสร้าง catalase สร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้ง ย่อยเคซีน และสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และซูโครสได้ (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับ The Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 สามารถจัดอยู่ในสกุล *Bacillus*




***ภาพที่ 3*** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ไอโซเลต PDN15
ก. ลักษณะโคลีนีบนอาหาร NA ข.สัณฐานวิทยาของเซลล์ (ย้อมสีแกรม) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า
ค. สัณฐานวิทยาของเซลล์ (ย้อมเอนโดสปอร์(ศรชี้)) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

***ตารางที่ 3*** คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PDN15

| **คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี** | **ชนิดของเชื้อ** | |
|---|---|---|
| | PDN15 | *Bacillus*[1/] |
| การติดสีแกรม | +[2/] | + |
| ตำแหน่งของเอนโดสปอร์ | C[4/] | C |
| รูปร่างของสปอร์ | E[5/] | E |
| การเคลื่อนที่ของเซลล์ | + | + |
| การสร้างเอ็นไซม์ catalase | + | + |
| การย่อยแป้ง | + | + |
| การย่อยเคซีน | + | + |
| การหมักน้ำตาล | | |
| - น้ำตาลกลูโคส | + | + |
| - น้ำตาลแลคโตส | -[3/] | - |
| - น้ำตาลซูโครส | + | + |

[1/] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (William, 1994)
[2/] + = positive for 90 – 100% [3/] - = negative for 90 – 100%
[4/]C = Central [5/] E = Ellipsoidal

## สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบมะเขือเทศโดยวิธีการล้างใบสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวนมากกว่าวิธี leaf printing และเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อรา *Stemphylium* sp. สาเหตุโรคใบจุดสีเทาของมะเขือเทศด้วยวิธีการ dual culture และ detached leaf พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Stemphylium* sp.

ได้ดีที่สุดคือ *Bacillus* sp. เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *Stemphylium* sp. บนใบก่อน อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุดที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

**เอกสารอ้างอิง**

.Ajilogba, C.F., Babalola, O.O. & Ahmad, F. (2013). Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Ethno Medicine*, *7*(3), 205-216.

Hussein, M.A.M., Hassan, M.H.A., Allam, A.D.A. & Abo-Elyousr, K.A.M. (2007). Management of *Stemphylium* blight of onion by using biological agents and resistance inducers. *Egyptian Journal of Phytopathology*, *35*(1), 49-60.

Inwang, B. (1987). Control of *Rhizoctonia solani* KUEHN by microorganisms selected from agricultural soils. Master Thesis. Department of plant pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Thailand. (*in* Thai).

Jareanruk, P. (2007). Applicationof antagonistic bacteria for the control of tomato black leaf mold caused by *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton. Master Thesis. Department of plant pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Thailand. (*in* Thai).

Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. & Beer, S.V. (1996). Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. *Biological Control*, *86*(8), 856-863.

Nainwal, D. & Vishunavat, K. (2016). Management of purple blotch and *Stemphylium* blignt of onion in Tarai and Bhabar regions of Uttarakhand, India. *Journal of Applied and Natural Science, 8*(1), 150-153.

Nasehi, A., Kadir, J.B., Zainal, A.M.A., Wong, M.Y. & Abed, A.F. (2012). First report of gray leaf spot on pepper caused by *Stemphylium solani* in Malaysia. *Plant disease*, *96*(8), 1227.

Sariah, M. (1994). Potential of *Bacillus* spp. as biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. *Malaysian Applied Biology Journal, 23*(2), 53-60.

Sutthisa, W. (2002). Screening and application of phylloplane microorganisms to control *Alternaria brassicicola*, a causal agent of leaf spot on Chinese kale. Master Thesis. Department of plant pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Thailand. (*in* Thai)., 88p.

Sutthisa, W., Tapkhumram, P., Kanchanarat, W. & Arimastu, P. (2014). Efficiency of Thai medicinal plant extract to control *Colletotrichum* sp., a causal agent of mango anthracnose. *Khon Kaen Agricultural Journal*, *42* Supplement (1), 665-670.

Thummabenjapone, P. & Phola, S. (2007). A highly potential fungicide to control *Stemphylium* sp., a causal agent of gray spot of tomato. In *Proceeding The 8$^{th}$ National Plant Protection Conference*. (pp. 383-391). Phitsanulok: Thailand.

Williams, R.H. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA, Baltimore.