หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบจุดในกาแฟอาราบิก้า	
ผู้เขียน	นางสาวอภิญญา ศิรินันทา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อังสนา อัครพิศาล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	อ.ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดกาแฟอาราบิก้า พบเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ K01, K02 และ A03 นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อราจากผลกาแฟได้จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท K04 แล้วทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า ไอโซเลท K02 ให้อาการของโรครุนแรงที่สุด ส่วนเชื้อราจากผลกาแฟ ไอโซเลท K04 ทดสอบการเกิดโรคบนผลกาแฟเชอรี่และใบกาแฟ พบว่า ทำให้เกิดแผลจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ต่อมาขยายลุกลามทั่วทั้งผล เมล็ดกาแฟบุ๋มลงไปเล็กน้อย ส่วนอาการบนใบ พบจุดสีน้ำตาลบริเวณขอบมีสีเหลืองล้อมรอบ เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจัดจำแนกชนิดพบว่า ไอโซเลท K02 คือเชื้อรา *Cercospora coffeicola* และ ไอโซเลท K04 คือเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากต้นกาแฟ สามารถแยกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. coffeicola* และ *Colletotrichum* sp. โดยวิธี dual culture technique พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา 3 ไอโซเลท ได้แก่ A67, A74 และ A75 โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *C. coffeicola* เป็น 41.67, 58.33 และ 61.67 ตามลำดับส่วนเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เป็น 47.50, 58.34 และ 61.67 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดกะหล่ำปลี พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท A74 และ A75 ส่งเสริมการงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Bergy's Manual พบว่า ไอโซเลท A74 และ A75 อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งไอโซเลท A74 คือ *Bacillus megaterium* และ A75 คือ *Bacillus badius* ทั้งนี้จะนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มาพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงละลายน้ำเพื่อสะดวกต่อการใช้งาน โดยมีส่วนผสมหลักประกอบด้วย สารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมเข้ากับแป้งข้าวเจ้า 43.5 กรัม น้ำมันรำข้าว 1.5 มิลลิลิตร และซูโครส 5 กรัม เมื่อผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นให้เข้ากันแล้วเก็บในถุงพลาสติกซิป เมื่อผลิตเสร็จเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน และนำสารชีวภัณฑ์ดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. coffeicola* และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. พบว่า ชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ A67 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทได้ ส่วนชีวภัณฑ์ A74 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเป็น 60 และ 61 ตามลำดับ ชีวภัณฑ์ไอโซเลท A75 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเป็น 55 และ 64 ตามลำดับ พร้อมทั้งมีการตรวจนับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารชีวภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถมีชีวิตรอดได้ในสารชีวภัณฑ์มากกว่า 3 เดือน การทดสอบประสิทธิภาพสารชีวภัณฑ์ในการลดการเกิดโรคใบจุดกาแฟอาราบิก้าในสภาพโรงเรือน พบว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทในการควบคุมเชื้อรา *C. coffeicola* และ *Colletotrichum* sp. กรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท A74 และ กรรมวิธีที่มีการฉีดพ่นชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท A75 ก่อน หรือ หลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ 24 ชั่วโมง สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว และ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นชีวภัณฑ์ที่ไม่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้วปลูกเชื้อรา ขนาดของแผลมีความแตกต่างกันกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นชีวภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Bioproduct Development of Antagonistic Bacteria for Controlling Leaf Spot Disease in Arabica Coffee	
Author	Miss Apinya Sirinunta	
Degree	Master of Science (Plant Pathology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan	Advisor
	Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang	Co-advisor

ABSTRACT

Sample of leaf spot diseases in Arabica coffee were collected to isolate the causal organisms. Isolated fungi were purified using single spore isolation technique. The leaf spot diseases were found three isolates of fungus: K01, K02 and A03. The coffee berry disease was placed directly on PDA and found one isolate as K04. Pathogenicity tests were conducted on leaf and berry coffee. The K02 isolate induced the highest severity symptom on leaf coffee and K04 isolate induced symptoms on leaf and berry coffee. Based on cultural and morphological study after light microscope, K02 and K04 isolates pathogen were identified as *Cercospora coffeicola* and *Colletotrichum* sp. respectively. Total of thirty isolates of antagonistic bacteria were obtained from rhizosphere of coffee. The isolates were purified and assayed to inhibit growth of fungus by dual culture technique. Among the 30 isolates tested, 3 isolates as A67, A74 and A75 showed the highest percentage of growth inhibits against *C. coffeicola* with 41.67%, 58.33%, 61.67 % and *Colletotrichum* sp. with 47.50%, 58.33% and 61.67% respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Based on the morphological and biochemical properties, isolates A74 and A75 were identified follow by Bergy's Manual belonging to *Bacillus* group. Isolate A74 is *Bacillus megaterium* and isolate A75 is *Bacillus badius*. Three isolates of antagonistic bacteria includes A67, A74 and A75 were developed of powder bioproduct including bacteria suspension in 0.85% NaCl 20 milliliter, mixed with rice flour 43.5 gram, rice bran oil 1.5 milliliter and sucrose 5 gram. After that, the mixture completely were oven dried at 45˚C for 12 hours and then bioproduct were blended to form a powder. Each bioproducts were stored under condition at room temperature. Afterwards, bioproducts were counted the quantity of antagonistic bacteria cells every month until 3 months. Also the study showed a few decreasing of antagonistic bacteria when compared with the first after product and have ability to survive for more than 3 months. Three bioproducts were assayed to inhibit growth of fungus by dual culture technique. The result showed that bioproduct from A67 could not inhibit mycelium pathogen. The bioproduct from A74 was the most effective growth inhibit mycelium of *C. coffeicola* and *Colletotrichum* sp. showed percentage of growth inhibit with 60 and 61% respectively and bioproduct A75 showed percentage of growth inhibit with 55 and 64% respectively. The efficacy for controlling leaf spot disease of bioproduct in the greenhouse was tested. The pathogen *C. coffeicola* and *Colletotrichum* sp. leaf spot disease severity reduce when spraying bioproduct A74 for 24 hour before or after the pathogen inoculation. The bioproduct A75 sprayed for 24 hours before or after pathogen inoculated statistically significant not difference but compared with the control has statistically significant difference.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved