รายงานประจำปีตามโครงการวิจัยรหัสที่ 3060-3204

งบประมาณ 2543-2544

เรื่อง การควบคุมโรคใบจุดใบไหม้ของสตรอเบอรี่โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

Control of Leaf Spot and Leaf Blight of Strawberry with Antagonistic Microorganisms

คณะผู้วิจัย

หัวหน้างานวิจัย

รศ. ดร. นุชนารถ จงเลขา

ผู้ร่วมงานวิจัย

นางสาวกาญจนา วิชิตตระกูลถาวร

นางสาวรัติกาล ธัญหล้า

นายยอดชาย นิ่มรักษา

นางสาววิรัชนีย์ เต๋จ๊ะวันดี

บทคัดย่อ

นำใบสตรอเบอรี่ที่มีอาการของใบจุดตานกและอาการใบไหม้ จากแปลงปลูกของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มาศึกษาพบว่าโรคใบจุดตานก เกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* และโรคใบไหม้โฟมอพซิสเกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของราทั้ง 2 ชนิด พบว่า *R. tulasnei* มีการเจริญช้ามากและไม่สร้างสปอร์บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงโดยวิธี Culture Disc แต่ถ้าใช้วิธี Spread Plate ที่อุณภูมิ 18 ^{0} C ในสภาพมืด พบว่าเชื้อรามีการสร้างสปอร์จำนวนมากในเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อรา *P. obscurans* เจริญได้ดีบนอาหาร PDA และสร้างโครงสร้าง pycnidia จำนวนมากบน PDA เมื่ออายุ 21 วัน

ทำการแยกราปฏิปักษ์จากดินและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากผิวใบสตรอเบอรี่ โดยวิธี Dilution Plate ได้ราปฏิปักษ์จากดิน 38 ไอโซเลท และได้แบคทีเรียจากผิวใบสตรอเบอรี่จำนวน 18 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด บนอาหาร PDA และ NAในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้ Dual Culture Technique พบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดีจำนวน 5 ไอโซเลท เป็นรา Trichoderma 3 ไอโซเลท คือ CMU 2000-9 CMU 2000-14 และ CMU 2000-16 ซึ่งได้ศึกษาและจัดจำแนกชนิดของราปฏิปักษ์พบว่าเป็นรา *Trichoderma viride* *T. harzianum* และ *T. hamatum* ตามลำดับ ส่วนอีก 2 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรีย คือ CMUb 2000-1 และ CMUb 2000-6 และเมื่อนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. tulasnei* และเชื้อรา *P. obscurans* ผลปรากฏว่า *T. viride* ยับยั้งการเจริญของ *R. tulasnei* ได้ 39.15% และ *P. obscurans* ได้ 54.84% สูงกว่า Trichoderma ชนิดอื่นๆ การศึกษาการเป็นปรสิตของราปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุพบว่า *T. viride* ทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุทั้งสองชนิดด้วยการแทงทะลุเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใย ทำให้เส้นใยของราสาเหตุแฟบลงในเวลาต่อมา

Abstract

Strawberry leaves with the symptoms of bird-eye spot and blight from the farmer's fields in Samoeng and Chomtong districts, Chiang Mai were brought to study. It was found that the bird-eye leaf spot is caused by *Ramularia tulasnei* and the leaf blight is caused by *Phomopsis obscurans*. Studying growth and sporulation of the two pathogens showed that *R. tulasnei* grew very slowly and did not produce spore when Culture Disc Technique was used ; Spread Plate Technique at 18 °C under dark condition could make the fungus grew quickly and produce plenty of spore in 7 days. *P. obscurans* grew well and produced spores abundantly on PDA, 21 days after inoculation.

Isolation of antagonistic fungi from cultivating soil and antagonistic microorganisms from strawberry leaves were made by using Dilution Plate Technique. Thirty eight fungal isolates were obtained from the soil and 18 bacterial isolates from the leaves. All isolates were tested on their efficacy to inhibit growth of 8 plant pathogenic fungi on PDA and NA under the laboratory conditions, by using Dual Culture Technique. Five isolates of all showed tendency to be antagonist, ability to inhibit growth of the fungal pathogen. Three of which are Trichoderma of the isolates CMU 2000-9, CMU 2000-14 and CMU 2000-16. Identification of the three isolates revealed that they are *Trichoderma viride*, *T. harzianum* and *T. hamatum* respectively. The rest two isolates are bacteria, isolates CMUb 2000-1 and CMUb 2000-6. The selected antagonistic microorganisms were then tested on their efficacy to inhibit growth of *R. tulasnei* and *P. obscurans*. It was shown that *T. viride* inhibited growth of the former at 39.15% and the later at 54.84%, higher percentages than other isolates. Parasitism of *T. viride* on both fungal pathogens showed that mycelium of the antagonist penetrated and invaded into the pathogen hyphae and then made the hyphae collapse.

บทนำ

สตรอเบอรี่ (*Fragaria fragariae*) เป็นไม้ผลเมืองหนาวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคเหนือ ปลูกมากที่จังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย เนื่องจากให้ผลตอบแทนสูงในระยะเวลาอันสั้น โดยในพื้นที่ 1 ไร่ สามารถปลูกสตรอเบอรี่ได้ผลผลิตประมาณ 2,500 – 3,000 กิโลกรัม ราคาที่เกษตรกรขายเพื่อบริโภคสดในปัจจุบันประมาณกิโลกรัมละ 40 – 50 บาท นอกจากนี้ ผลสตรอเบอรี่ยังสามารถแปรรูปเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนไว้จำหน่ายได้อีกด้วย เช่น ทำแยม ไวน์ สตรอเบอรี่แห้ง เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) แต่สตรอเบอรี่เป็นพืชที่มีโรคและแมลงทำลายอยู่หลายชนิด เช่น โรคทางใบของสตรอเบอรี่ ได้แก่ โรคใบจุดตานก เกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* Sacc. โรคใบไหม้โฟมอพซิส เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh) นับว่ามีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต ส่วนการป้องกันโรคมักนิยมใช้สารเคมี เพราะเป็นวิธีที่สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่อง ได้สร้างปัญหาต่าง ๆ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรเอง ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมี ได้แก่ ปัญหาทางเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง โรคและแมลงศัตรูพืชต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้าง ที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิต ทางการเกษตร ที่มีผลกระทบต่อผู้บริโภค และปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม

การแก้ไขหรือลดปัญหาต่างๆ จากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชวิธีหนึ่งที่สามารถกระทำได้ คือ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (biological control) เช่น การใช้เชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัยซีสบางชนิด ที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืช แต่สามารถยับยั้งการทำลายของเชื้อโรคได้ การใช้จุลินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านี้สามารถควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นไปอย่างต่อเนื่องในระยะยาว นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตร และสภาพแวดล้อมอีกด้วย

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติและนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุในห้องปฏิบัติการและนำเอาชนิดที่ทดสอบได้ผลดีมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและโรคใบไหม้ของสตรอเบอรี่ โดยหวังว่าจะสามารถนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพนี้ไปเผยแพร่ให้เกษตรกรผู้ปลูกสตรอเบอรี่เพื่อใช้ทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

การตรวจเอกสาร

สตรอเบอรี่ เป็นพืชที่อยู่ใน Order Rosales Family Rosaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Fragaria fragariae* (ชูพงษ์, 2530) ในปัจจุบันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจพืชหนึ่งที่ทำรายได้ค่อนข้างดี โดยมีพื้นที่การผลิตส่วนใหญ่อยู่ในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย เพราะมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม ที่สตรอเบอรี่สามารถให้ผลผลิตได้ระหว่างเดือนธันวาคมถึงมีนาคม รวมพื้นที่การผลิตทั้งประเทศประมาณ 2,600 – 3,000 ไร่ต่อปี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541)

สตรอเบอรี่ เป็นพืชหนึ่งที่มีศัตรูพืชรบกวนมาก นับตั้งแต่ระยะกล้าไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว โรคที่เกิดจากเชื้อราเป็นโรคที่พบอย่างกว้างขวาง และสามารถเข้าทำลายได้ในทุกส่วนของลำต้น คือ ใบ ดอก ผล และราก ได้แก่ โรครากเน่าและโคนเน่า สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora fragariae*, *Fusarium* sp และ *Rhizoctonia* spp. โรคแอนแทรคโนสของไหล สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โรคใบจุดตานก สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* โรคใบไหม้ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* โรคขอบใบไหม้ สาเหตุเกิดจากเชื้อเรา *Diplocarpon earlianum* โรคราสีเทา สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* โรคผลเน่า สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ชูพงษ์, 2530) โรคทางใบที่สำคัญของสตรอเบอรี่ที่พบว่ามีการแพร่ระบาดเป็นประจำในพื้นที่การปลูกสตรอเบอรี่ ได้แก่ โรคใบจุดตานก และโรคใบไหม้โฟมอพซีส (Maas,1998)

โรคใบจุดตานก (Bird's eye leaf spot) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* Sacc (telemorph : *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindaee มีรายงานการพบโรคนี้ทั่วโลก ทั้งในสตรอเบอรี่พันธุ์ปลูก และสตรอเบอรี่พันธุ์ป่า เป็นโรคที่มีความสำคัญมากที่สุด (Maas, 1998)

ลักษณะอาการของโรคใบจุดตานก อาการที่เกิดบนใบในระยะแรกจะมีลักษณะเป็นจุดกลมขนาดเล็ก สีม่วง ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น บริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาล ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ขอบแผลมีสีม่วงแดง หรือสีน้ำตาลเข้มชัดเจน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล 3-6 มิลลิเมตร กรณีที่เกิดจุดจำนวนมากแผลอาจจะรวมกัน ทำให้เกิดอาการใบไหม้ และแห้งตายในที่สุด (Maas, 1998) นอกจากโรคนี้จะทำให้เกิดอาการบนใบแล้ว ยังทำให้เกิดอาการบนผล กลีบเลี้ยง ก้านใบ และไหลด้วย

ลักษณะเชื้อราสาเหตุ *Ramularia tulasnei* Sacc. ราชนิดนี้สร้างสปอร์ขยายพันธุ์ (asexual spore) ชื่อว่า conidium (พหูพจน์ conidia) รูปไข่ (elliptic) หรือรูปทรงกระบอก (cylindric)

ไม่มีสี (hyaline) อาจไม่มีผนังกั้น (septum) หรือมีผนังกั้น 1-4 อัน conidia มีขนาด 20 - 40 x 3 - 5 ไมครอน conidia เจริญอยู่บนก้านที่เรียกว่า conidiophore ซึ่งไม่แตกกิ่งก้าน ขนาดสั้นไม่มีสี ลักษณะโค้งงอและมีรอยที่เกิดจากการหลุดร่วงของสปอร์ (scar) ชัดเจน โดยทั่วไปมักพบเชื้อราในระยะที่ไม่ผสมพันธุ์ (imperfect stage) มากกว่าระยะที่มีการผสมพันธุ์ (perfect stage) โดยในช่วงฤดูใบไม้ร่วง จะพบเชื้อราระยะ telemorph มีชื่อว่า *Mycosphaerella fragariae* ซึ่งมีโครงสร้างสืบพันธุ์มีชื่อว่า ascocarp แบบ perithecium ซึ่งมีรูปร่างคล้ายคณโฑ ลักษณะกลมสีดำ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 100 – 150 ไมครอน มีช่องเปิด (ostiole) เล็กมาก ภายใน perithecium มีการสร้าง ascus (ถุงใส่สปอร์ผสมพันธุ์) ลักษณะคล้ายกระบอง (clavate) หรือรูปทรงกระบอก ขนาดประมาณ 30 – 40 x 10 – 15 ไมครอน ภายในแต่ละ ascus จะมีจำนวน ascospore (สปอร์ผสมพันธุ์ หรือ sexual spore) 8 อัน ขนาดประมาณ 12 - 15 x 3 – 4 ไมครอน ascospore ใสไม่มีสี มี 2 เซลล์ (Maas, 1998)

โรคใบไหม้โฟมอพซีส (Phomopsis Leaf Bilght) โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* (Eills & Everh) (Maas, 1998) มีรายงานการระบาดทั่วไปในแปลงปลูกสตรอเบอรี่ทั่วโลกในบางพื้นที่โรคนี้จัดว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากมีการระบาดรุนแรง ทำให้เกิดความสูญเสียผลผลิตสูง เชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่ข้ามฤดูปลูก โดยจะทำลายใบแก่ในฤดูร้อนทำให้พืชอ่อนแอ ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลงในปีต่อมา

ลักษณะอาการของโรคใบไหม้โฟมอพซิส อาการโดยทั่วไป เริ่มจากลักษณะแผลเป็นจุดกลม สีแดงจนถึงสีม่วง 1-5 จุดบนใบย่อย หลังจากนั้นแผลจะพัฒนาขยายใหญ่ขึ้น มีขอบแผลสีม่วงแดง หรือสีเหลือง บริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาล และพบโครงสร้างของเชื้อราชื่อ pycnidium (พหูพจน์ pycnidia) เป็นจุดกลมสีดำเป็นจำนวนมากบริเวณกลางแผล เมื่อแผลมีอายุมากขึ้น จะเข้าทำลายเส้นกลางใบ และพัฒนาใหญ่ขึ้นกลายเป็นแผลรูปตัววี (V–shaped) เชื้อราสาเหตุสามารถเข้าทำลายไหลก้านใบ กลีบเลี้ยง และผลได้

ลักษณะเชื้อราสาเหตุ *Phomopsis obscurans* เชื้อรานี้จะสร้าง conidia จำนวนมากอยู่ใน pycnidia โดยฝังอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบพืช รูปร่างกลม สีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 140-210 ไมครอน มีช่องเปิด (ostiole) สั้น ๆ โผล่พ้นผิวพืชออกมา conidiophore ใส มีความยาวได้ถึง 85 ไมครอน conidia เซลล์เดียวลักษณะบางใส รูปร่างทรงกระบอกสั้นหัวท้ายมน ขนาด 5.5 – 7.5 x 1.5 – 2 ไมครอน ภายใต้สภาพความชื้นที่เหมาะสม conidia จำนวนมากจะถูกปลดปล่อยออกมาจาก pycnidia เป็นสายคล้าย ๆ วุ้นใส หรือเป็นกลุ่มของ conidia จำนวนมาก (mass of conidia) เป็นก้อนกลม ๆ ส่วนลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร PDA จะเป็นเส้นใยสีขาว บาง แผ่ขยายไปบนผิว

หน้าอาหาร มี pycnidia กระจายอยู่บนโคโลนี โดยจะพบมากที่สุดบริเวณใกล้ ๆ กับจุดที่ปลูกเชื้อลงไป pycnidium มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 300 ไมครอน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า pycnidium ที่เกิดขึ้นบนแผลตามธรรมชาติ (Maas, 1998)

การป้องกันกำจัด

การป้องกันกำจัดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* และโรคใบไหม้ของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* ทำได้หลายวิธีได้แก่ การใช้พันธุ์ที่ปลอดโรคและต้านทานโรค ใช้ต้นไหลที่แข็งแรงจากต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดโรคและต้านทานโรค การทำลายเศษซากพืชทันทีหลังเก็บเกี่ยว และการใช้สารเคมี วรรณวิภา (2532) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* บนอาหาร SLDA (Strawberry Leaf Dextrose Agar) โดยใช้สารเคมีประเภทดูดซึมผสมกับสารเคมีประเภทสัมผัส สัดส่วน 1 : 1 ของอัตรากลางที่ฉลากระบุไว้ โดยใช้สารกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมได้แก่ Derosal 60 และ Benlate 75 C ผสมกับสารประเภทสัมผัส ได้แก่ Antracol Captan 50 WP และ Dithane M-45 โดยผสมระหว่างสารดูดซึมกับสารสัมผัส เลี้ยงเชื้อโดยวิธี SPT (Spread Plate Technique) พบว่าเชื้อราไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อราได้เลยในทุกกรรมวิธี ส่วนชุดควบคุม (control) การเจริญของเชื้อราเป็นไปตามปกติ การทดสอบสารเคมีในการควบคุมโรคในแปลงปลูก พบว่าสารเคมีที่ให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุดคือ Benlate 75 C ผสมกับ Antracol รองลงมาคือ Benlate 75 C ผสม Captan 50 WP และ Derosal 60 ผสมกับ Antracol ตามลำดับ โดยสารเคมีทุกชนิดที่ใช้สามารถลดความเสียหายจากโรคได้ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ถึงแม้ว่าการป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้สารเคมี จะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว สามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดอย่างรุนแรงขึ้นมาเป็นครั้งคราวได้ แต่การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่องได้สร้างปัญหาและก่อให้เกิดผลกระทบต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ ปัญหาทางเศรษฐกิจทำให้ต้นทุนการผลิตสูง โรคและแมลงศัตรูพืชต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่มีผลกระทบต่อผู้บริโภค และปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม ซึ่งหลายประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา และกลุ่มประเทศในยุโรปได้เริ่มกำหนดนโยบายการลดปริมาณการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชลง ขณะเดียวกันได้พยายามแสวงหาวิธีการควบคุมศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีหรือหาสิ่งทดแทน เพื่อให้มีการใช้สารเคมีลดลง (จิระเดช, 2534) วิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ไขหรือลดปัญหาต่าง ๆ จากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชคือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (biological control)

การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ หมายถึง การลดปริมาณของ inoculum หรือการลดปฏิกิริยาการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุที่อยู่ในระยะที่ไม่มีปฏิกิริยาหรือระยะพักตัว ด้วยการใช้จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งหรือมากกว่า 1 ชนิด ให้บรรลุผลสำเร็จในสภาพธรรมชาติ หรือด้วยการจัดการสภาพแวดล้อมของพืชอาศัย หรือเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Baker และ Cook, 1974)

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคพืช (plant pathogen) มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ แต่ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าว อาจจะผันแปรไปตามแหล่งและสถานที่ซึ่งต่างกันออกไป และสภาวะอากาศที่แตกต่างกันในแต่ละปี โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคสามารถหาได้จากบริเวณซึ่งเคยมีโรคระบาด จากโรคใดโรคหนึ่ง แต่ต่อมาไม่พบการระบาดของโรคนั้น หรือพบว่ามีการระบาดลดลงทั้งๆ ที่มีการปลูกพืชอาศัยที่อ่อนแอ (susceptible host plants) ก็ไม่พบการเกิดโรค (เกษม, 2532 ก.) จากข้อสังเกตดังกล่าวนี้ จึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความผันแปรของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคในแหล่งปลูกพืชแต่ละแห่ง การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เริ่มจากการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีโรคระบาด จากพืชที่เป็นโรคหรือจากดินที่มีคุณสมบัติดีคือทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี และมีความต้านทานโรค จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจดูคุณสมบัติของการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับการศึกษาและพบว่ามีความสามารถในการควบคุมโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง คือเชื้อรา มีรายงานการศึกษาโดย Tronsmo และ Rao (1977) ว่า เชื้อรา *Trichoderma pseudokoningii* สามารถยับยั้งการเจริญและเป็นปรสิตกับเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคเน่าแห้งของต้นแอปเปิล โดยเส้นใยของเชื้อรา *T. pseudokoningii* พันรัดรอบเส้นใยและแทงเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ นอกจากนั้นยังมีการทดสอบในโรงเรือน ที่ควบคุมสภาพแวดล้อม โดยการปลูกเชื้อราสาเหตุ ร่วมกับ spore suspension ของ *T. pseudokoningii* พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดี แต่เมื่อนำไปทดสอบในสวนผลไม้ พบว่าราปฏิปักษ์นี้ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ และยังได้รายงานถึงวิธีการควบคุมโรคเน่าก่อนการเก็บเกี่ยวของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Mucor mucedo* ในแปลงปลูกโดยการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T.viride* และ *T. harzianum* พบว่าสามารถลดระดับของการเกิดโรคได้ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี dichlorofluanid Elad และคณะ (1980) รายงานว่า *T. harzianum* สามารถควบคุมโรคกล้าเน่า (damping – off) ที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* ในถั่ว มะเขือเทศ และฝ้ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ Ahmad และ Baker (1987) ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพในพืชต่างๆ ได้แก่ ถั่ว, แตงกวา, ข้าวโพด, มะเขือเทศ และแรดิช พบว่าการใช้ mutants ของ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้สูงกว่า *T. harzianum* ที่เป็น wild

type นอกจากนี้ยังพบว่า mutants ของรานี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้มากกว่า โดยปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการแข่งขันกับราที่เป็น saprophyte และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่อยู่รอบ ๆ รากพืช เชื้อรา Trichoderma นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นเชื้อราปฏิปักษ์แล้ว ยังมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช จึงมีการใช้เชื้อราชนิดนี้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชสวน (Whipp และ Lumsden, 1991) ต่อมา Sutton และ Peng (1993) ได้รายงานผลการควบคุมโรคทางใบของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* โดยทำการปลูกเชื้อราลงบนใบสตรอเบอรี่ หลังจากนั้น 2-5 สัปดาห์ ทำการพ่นสปอร์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *Rhodotorula glutinis*, *Fusarium* sp., *Myothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp., *Gliocladium roseum* เทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราชื่อ chlorothalonil ผลปรากฏว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *G. roseum*, *Penicillium* sp. และ *T. viride* สามารถลดปริมาณการสร้าง conidiophore ของเชื้อได้ 97 – 100% ในสภาพเรือนทดลอง สองปีต่อมา Belanger และคณะ (1995) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ *T. harzianum* ในการควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของการปลูกสตรอเบอรี่

นอกจากเชื้อราแล้วยังพบว่ามีแบคทีเรียบางชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดย Fravel และ Spurr (1971) ทำการแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากใบยาสูบ พบแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria alternata* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาล 1 ชนิด คือเชื้อ *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ถึง 88% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม Broadbent และคณะ (1977) รายงานว่ามี *Bacillus* spp. หลาย strain ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ต่อต้านโรค เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิต endospore ที่ทนต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้ เช่น *B. subtilis* A_{13} ซึ่งแยกได้จากเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิดและมีความสามารถในการเจริญครอบคลุมบริเวณรากพืชทั้งในสภาพแปลงปลูกและสภาพห้องปฏิบัติการ

ในประเทศไทย มีผู้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช เช่น บรรเจิด (2530) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas fluorescens* ที่แยกได้จากดินที่ใช้ในการเพาะปลูกในการควบคุมโรคพืช พบว่า *T. harzianum* และ *T.viride* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* ได้ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลงถึง 99.4 และ 98.8 เปอร์เซ็นต์ กาญจนา (2539) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 12 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. และ *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวของ

สตรอเบอรี่ พบว่า *T. viride* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ได้สูงสุดโดยทำให้เส้นใยของเชื้อราเหี่ยวแฟบลง และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยการเข้าไปเจริญในเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* sp. พัชรินทร์ (2540) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา Trichoderma 9 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. บนอาหาร PDA วัดผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตได้ไอโซเลทที่ให้ผลในการยับยั้ง 4 ไอโซเลทด้วยกันคือ CMU-T1(*Trichoderma harzianum*), CMU-T3 (*T. polysporum*), CMU-T6 (*T. viride*) และ CMU-T8 (*T.viride*) และได้ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของสตรอเบอรี่ที่ปลูกไว้ในถุงปลูกโดยการคลุกเชื้อสาเหตุของโรคและเชื้อราปฏิปักษ์ลงไปในดินที่ผสมเป็นวัสดุปลูกกับสตรอเบอรี่ 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ Nyoho, พันธุ์พระราชทาน 20, พันธุ์พระราชทาน 50 และพันธุ์พระราชทาน 70 ที่อยู่ภายในโรงเรือน ผลปรากฏว่า CMU-T3 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเฉพาะพันธุ์พระราชทาน 20 ส่วนพันธุ์พระราชทาน 50 และพันธุ์พระราชทาน 70 ไม่มี Trichoderma ไอโซเลทใดที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้เลย กาญจนา (2542) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน 5 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แบคทีเรียและรา จำนวน 165 ไอโซเลท นำจุลินทรีย์ที่ได้ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacerum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบแบคทีเรียจำนวน 40 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวได้ ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ RH_{14} (*Bacillus cereus*) RH_{19} (*Pseudomonas aeruginosa*) และ RH_{39} (*Ps. putida*) จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศพันธุ์ Pep. T. K. ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถชะลอการเกิดโรคและลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลงได้ในทุกกรรมวิธี เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว ในขณะที่การทดสอบในสภาพแปลงปลูก พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม มานะ และคณะ (2543) ทำการแยกราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินป่าและดินเกษตรกรรมในภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 183 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกทุกสายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางภาคใต้ 3 ชนิดคือ เชื้อรา *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *Selerotium rolfsii* โดยใช้ Dual Culture Technique ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ของราปฏิปักษ์ในดินเกษตรกรรมมีประสิทธิภาพดีกว่า Trichoderma ในดินป่า โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีได้แก่ *T. harzianum*, *T. viride* และ *Gliocladium virens* ในปีเดียวกัน ยอดชาย (2543) ได้รายงานผลการแยกราปฏิปักษ์จากดินบริเวณแปลงปลูกสตรอเบอรี่ในจังหวัดเชียงใหม่ พบเชื้อราจำนวน 38 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ

โรคพืช 8 ชนิด คือ *Rhizoctonia* sp. *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis obscurans*., *Phaeoisariopsis griseola*, *Septoria* sp. *Alternaria solani* และ *A. brassicicola* ในสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหาร PDA โดยใช้ Dual Culture Technique พบราปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CMU2000-9, CMU2000-14 และ CMU2000-16 เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้พบว่า ไอโซเลท CMU 2000-9 คือ *Trichoderma viride*, ไอโซเลท CMU2000 –14 คือ *T. harzianum* และไอโซเลท CMU2000 –16 คือ *T. hamatum*

โครงการหลวง

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดและโรคใบไหม้และการแยกเชื้อราสาเหตุ

ทำการเก็บตัวอย่างใบสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการใบจุดและอาการใบไหม้ จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย มาศึกษาและบันทึกลักษณะอาการของโรคทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free Hand Section โดยการใช้ใบมีดโกนที่คมและสะอาดตัดบริเวณที่เป็นแผลตามขวางแล้วทำการ mount slide ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นปิดด้วย cover glass แล้วนำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นจึงทำการแยกเชื้อ (isolation) โดยตัดแผลบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติ ให้มีขนาดประมาณ 3 x 3 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นพืชไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวันประมาณ 30°C กลางคืน 25 ^{o}C) หลังจากที่เส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืชแล้ว จึงทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธี Hyphal Tip Isolation จากนั้นตรวจดูลักษณะรูปร่างของโคโลนี และสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด และนำสปอร์มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) เก็บเชื้อราบนอาหาร PDA slant เพื่อเป็น stock culture ไว้ใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

3.2 การแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน และใบสตรอเบอรี่

3.2.1 การแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน

นำเชื้อราปฏิปักษ์จาก stock culture บนอาหาร PDA slant ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณแปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 38 ไอโซเลท ที่ได้ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิดคือ เชื้อรา *Rhizoctonia* sp. , *Fusarium* sp. , *Colletotrichum* sp. , *Phomopsis obscurans* , *Phaeoisariopsis griseola* , *Septoria* sp. , *Alternaria solani* และ *A. brassicicola* ได้เชื้อรา Trichoderma ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 8 ชนิดได้ดี 3 ชนิด (species) ด้วยกันคือ *Trichoderma viride* (CMU2000-9), *T. harzianum* (CMU2000-14) และ *T. hamatum* (CMU2000-16) (ยอดชาย, 2543) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี CDT (Culture Disc Technique) จนกระทั่งเชื้อรามีอายุ 7 วัน จึงนำไปใช้ทดลองต่อไป

3.2.2 การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากใบสตรอเบอรี่

นำใบสตรอเบอรี่บริเวณแปลงปลูกของเกษตรกร จากอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนผิวใบของสตรอเบอรี่ (epiphytic bacteria) โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร NA โดยนำน้ำปลอดเชื้อที่ล้างใบสตรอเบอรี่มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} จนถึง 10^{-7} ในการทดสอบเบื้องต้นคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยจะปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียในระยะห่างพอดีสำหรับนำไปใช้แยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นใช้ micropipette ดูดเซลล์แบคทีเรียแขวนลอย แต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ความเข้มข้นละ 5 จาน นำจานอาหารไปบ่มเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 – 3 วัน หลังจากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย จากโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากไอโซเลทต่าง ๆ มาเก็บบนอาหาร NA slant เก็บไว้เพื่อใช้เป็น stock culture ในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4 – 7°C ไว้ศึกษาต่อไป

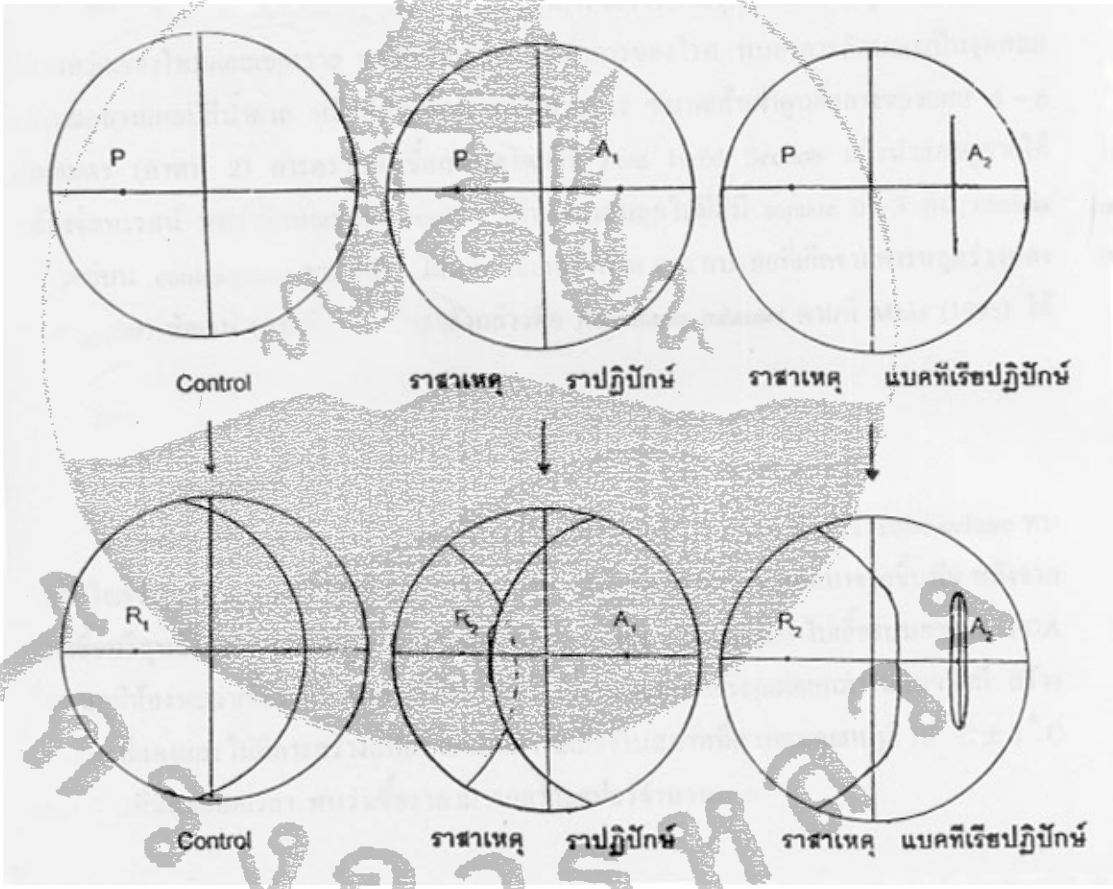
3.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่

นำเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานก คือ *Ramularia tulasnei* ที่เจริญบน PDA อายุ 14 วัน และเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิสคือ *Phomopsis obscurans* ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มาทดสอบโดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณรอบนอกของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ออกเป็นชิ้นเชื้อกลม ๆ (culture disc) จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด และชิ้นเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* ทั้ง 3 ชนิด (species) มาวางบนจานอาหารให้ห่างจากชิ้นของเชื้อสาเหตุที่ทดสอบประมาณ 4 เซนติเมตร ตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ทำโดยการใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด มาเลี้ยงบนจานอาหารโดยลากเป็นเส้นตรงยาวประมาณ 3 เซนติเมตรในแนวตั้งฉากกับเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นหนึ่งและขนานกับเส้นผ่าศูนย์กลางอีกเส้นหนึ่ง และห่างจากเชื้อราสาเหตุประมาณ 4 มิลลิเมตร ตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางซึ่งเป็นวิธีที่เรียกว่า Dual Culture Technique หรือ Biculture Technique (ภาพที่ 1) ในแต่ละกรรมวิธี (treatment) ทำ 5 ซ้ำ (replication) จากนั้นนำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเชื้อรา 7 วันหลังการปลูกเชื้อและคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรดังนี้ (เกษม, 2532 ก.)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

โดย R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (รา/แบคทีเรีย)

R_1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R_2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ภาพที่ 1 การวางเชื้อราทดสอบโดยวิธี Dual Culture Technique หรือ Biculture Technique

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดตานกและใบไหม้โฟมอพซีสและการรแยกเชื้อราสาเหตุ

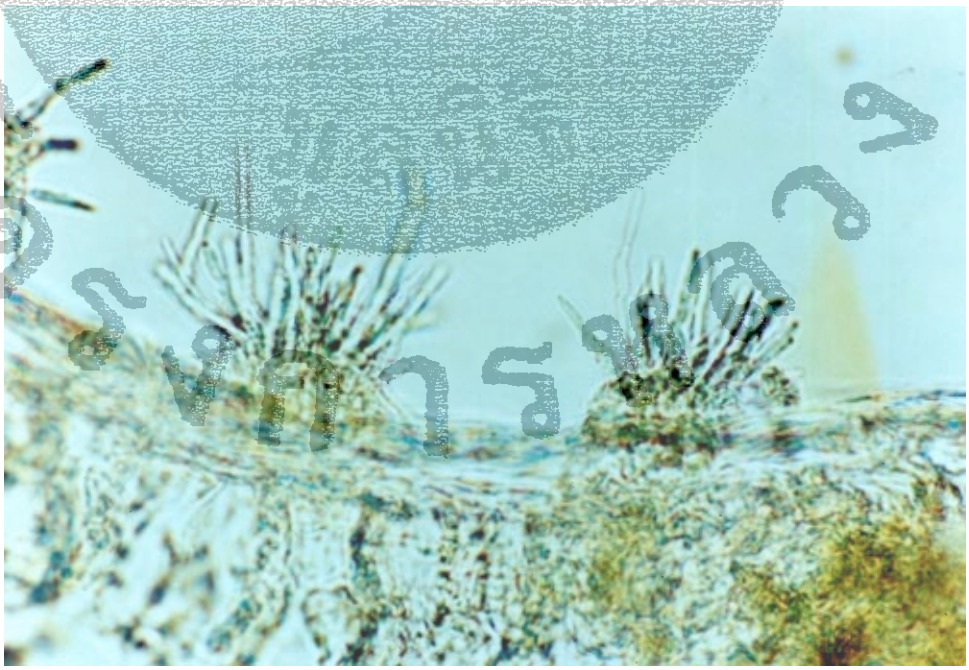
ลักษณะอาการของโรคใบจุดตานก (Bird-eye leaf spot)

จากการเก็บตัวอย่างใบสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการของโรคใบจุดจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย มาศึกษาและบันทึกอาการของโรค พบอาการลักษณะเป็นจุดกลมบริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาล หรือสีเทาขอบแผลมีสีม่วงแดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล 4 – 6 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) การตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยวิธี Free Hand Section แล้วนำส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะของ conidia รูปทรงกระบอกไม่มีสีมี septate 0 – 3 อัน conidia เจริญอยู่บน conidiophore ขนาดสั้น ไม่มีสี ไม่แตกกิ่งก้าน และพบรอยที่เกิดจากการหลุดร่วงของสปอร์ (scar) ชัดเจน (ภาพที่ 3) เชื้อราดังกล่าวคือ *Ramularia tulasnei* ตามที่ Maas (1998) ได้บรรยายไว้

ผลการแยกเชื้อสาเหตุ

เมื่อแยกเชื้อราสาเหตุบริเวณแผลที่ใบ โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วยวิธี tissue culture พบว่าเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นพืชช้ามาก ใช้เวลา 10 – 12 วัน จึงจะเจริญออกมาจากชิ้นพืช หลังจากแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยแยกปลายเส้นใย (Hyphal Tip Isolation Technique) ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องพบว่าเชื้อรามีการเจริญช้ามาก โคโลนีลักษณะกลมเจริญแผ่ออกมาในแนวรัศมี สร้าง pigment สีแดงและไม่มีการสร้างสปอร์ แต่เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาพที่ควบคุมอุณหภูมิ 18 °C ± 2 °C และอยู่ในที่มืดตลอดเวลา พบว่าเชื้อราสามารถสร้างสปอร์จำนวนมาก

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดตานกของสตรอเบอรี่ที่พบในแปลงปลูก ที่เกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei*



ภาพที่ 3 ลักษณะ conidiophore (a) และ conidia (b) ของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* (x 400)

ลักษณะอาการของโรคใบไหม้โฟมอพซิส (Phomopsis leaf blight)

จากการเก็บตัวอย่างใบสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการของโรคใบไหม้โฟมอพซิส จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงรายมาศึกษาและบันทึกอาการของโรค พบอาการในระยะแรกลักษณะเป็นจุดกลมสีม่วงแดง เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้น มีขอบแผลสีแดง หรือสีเหลือง กลางแผลมีสีน้ำตาลและพบโครงสร้างรูปคณโฑ คือ pycnidia เป็นจำนวนมาก เมื่อแผลมีอายุมากขึ้น จะพัฒนาเป็นรูปตัววี (V-shaped) (ภาพที่ 4) การตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยวิธี Free Hand Section แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ pycnidia ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบพืช รูปร่างกลม ส่วนคอด้านบน (ostiole) โผล่พ้นผิวพืชออกมา (ภาพที่ 5) เชื้อราดังกล่าวคือ *Phomopsis obscurans* ตามที่ Maas (1998) ได้บรรยายไว้

ผลการแยกเชื้อสาเหตุ

เชื้อราสาเหตุที่แยกได้จากบริเวณแผลที่ใบ เลี้ยงลงบนอาหาร PDA ปรากฏเป็นเส้นใยสีขาวเจริญออกมาจากชิ้นพืชภายใน 4 – 5 วัน เมื่อทำการแยกเชื้อโดยวิธี Hyphal Tip Isolation ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า เชื้อรามีลักษณะโคโลนีกลมเจริญออกมาในแนวรัศมี สีของโคโลนีเริ่มแรกเป็นเส้นใยสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีครีม เมื่อมีอายุ 21 วัน จะเริ่มพบโครงสร้าง pyenidia ปรากฏบนอาหาร รูปร่างและขนาดไม่แน่นอน

ภาพที่ 4 ลักษณะอาการของโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ในแปลงปลูก ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans*

ภาพที่ 5 โครงสร้าง pycnidia ของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* (x 200)

4.2 การแยกราปฏิปักษ์จากดิน และจุลินทรีย์จากใบสตรอเบอรี่

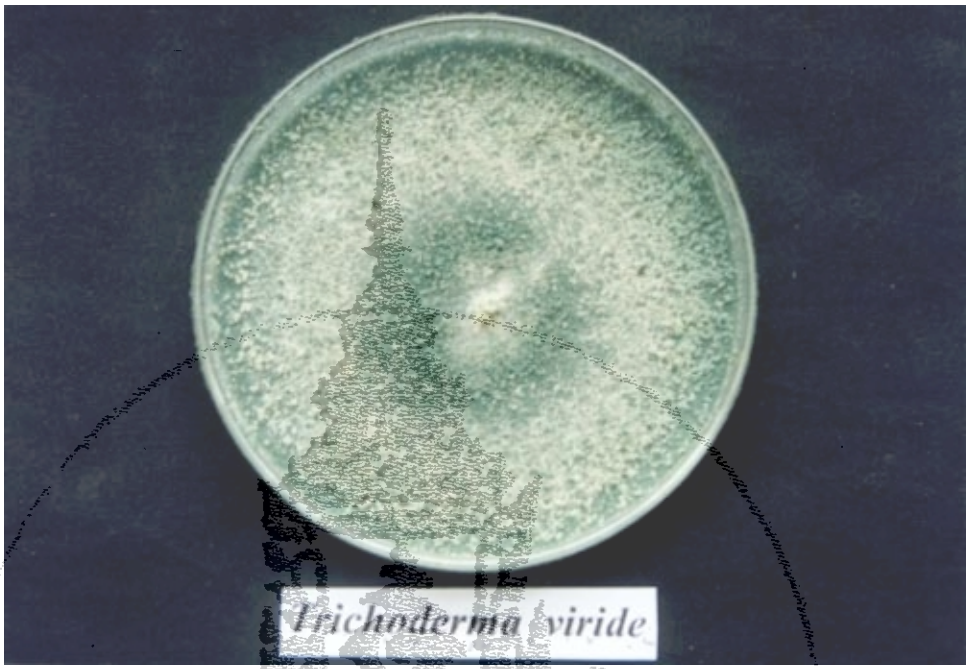
4.2.1 การแยกราปฏิปักษ์จากดิน

จากการนำเอาเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินบริเวณแปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี Soil Dilution ได้เชื้อรา 38 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด พบว่ามีรา 3 ไอโซเลท ซึ่งอยู่ในสกุล Trichoderma ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 8 ชนิด จึงได้ทำการจำแนกชนิดโดยการวัดขนาดของสปอร์ phialide ตำแหน่งของ phialide สีของโคโลนี และสปอร์ ใช้วิธีการจำแนก (key) ของ Domsch และ Game (1980) ใน Compendium of Soil Fungi พบว่ามีลักษณะต่างๆ ดังนี้

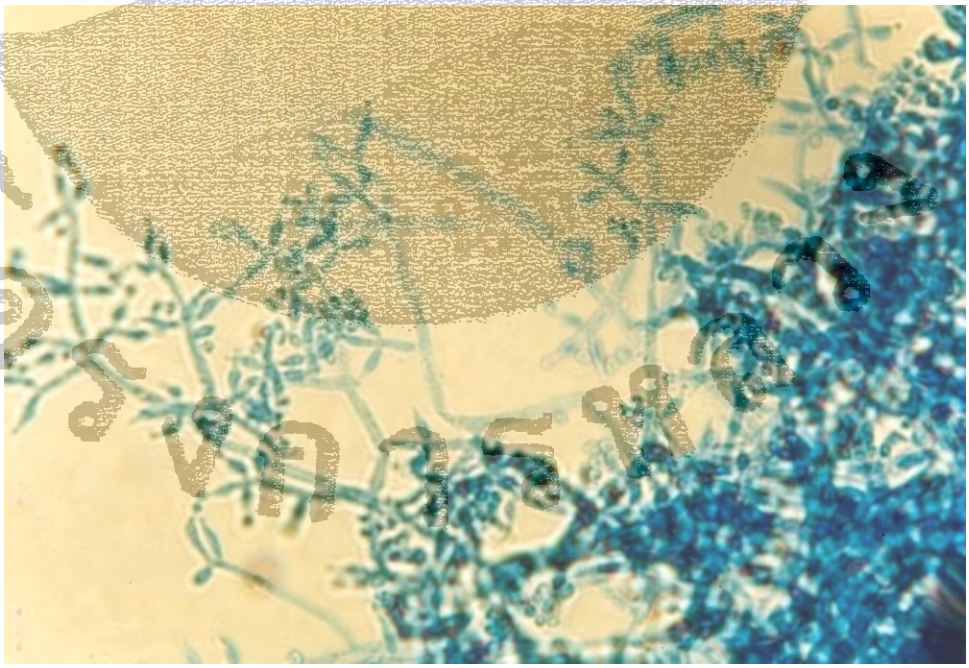
Trichoderma viride (ไอโซเลท CMU2000–9) มีลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA อย่างรวดเร็ว โคโลนีระยะแรกสีขาวใส ต่อมาโคโลนีมีสีเขียว (ภาพที่ 6) phialide เกิดเป็นกลุ่ม 2 – 3 อัน แต่ไม่ได้เรียงกันเป็นวงรอบก้าน และไม่ได้เกิดเป็นคู่ตรงข้ามกันตลอดกิ่งก้านที่แตกออกมา มีสีขาวใส ขนาด 10 x 2.5 ไมครอน phialospore ส่วนใหญ่รูปร่างกลม มีสีเขียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 ไมครอน และรวมกลุ่มที่ปลายของแต่ละ phialide เพื่อสร้างเป็นกลุ่มสปอร์ (ภาพที่ 7)

Trichoderma harzianum (ไอโซเลท CMU2000–14) มีการเจริญบนอาหาร PDA อย่างรวดเร็ว ระยะแรกบริเวณที่สร้างสปอร์มีสีเขียวปนขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวสด (ภาพที่ 8) phialide เกิดขึ้นเป็นกลุ่มมีจำนวนถึง 5 อัน อาจเกิดเดี่ยว ๆ ตามด้านข้างของกิ่งก้านที่แตกออกมา phialide สีใส มีขนาด 5 x 3 ไมครอน รูปร่างสั้น ส่วนฐานแคบกว่าตรงกลาง ส่วนบนเรียวจนถึงคอเป็นรูปกระสายปลายแหลม phialospore มีสีเขียวอ่อน รูปร่างกลม ขนาด 3 ไมครอน (ภาพที่ 9)

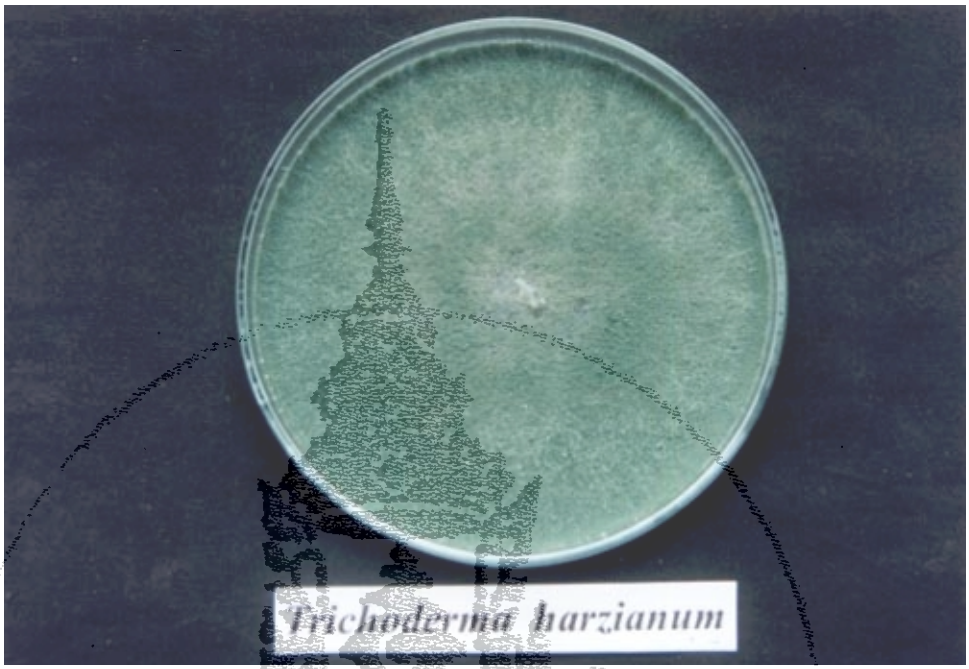
Trichoderma hamatum (ไอโซเลท CMU2000–16) มีการเจริญบนอาหาร PDA อย่างรวดเร็ว โคโลนีมีสีขาวใส เมื่อเจริญเต็มที่บริเวณที่สร้างสปอร์มีสีขาว หรือสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 10) phialide มีการรวมกลุ่มกันจำนวน 2 – 5 อัน เซลล์ที่อยู่ปลายสุดจะสร้างกิ่งก้านออกไปอีก phialide รูปร่างอ้วนสั้นไม่มีสี ขนาด 4.3 x 3.5 ไมครอน phialospore มีสีเขียวอ่อน รูปร่างคล้ายกระสวย หรือบางครั้งมีรูปร่างทรงกระบอก ขนาด 4.2 x 2.5 ไมครอน (ภาพที่ 11)



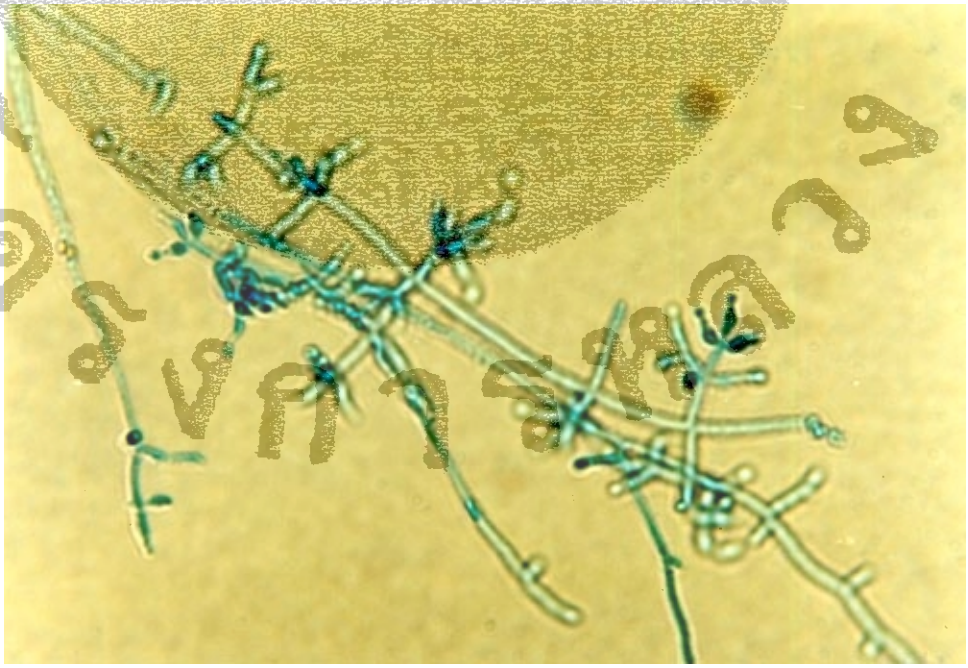
ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9) บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน



ภาพที่ 7 ลักษณะ conidiophore (a), phialide (b) และ conidia (c) ของเชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU 2000-9) (x400)

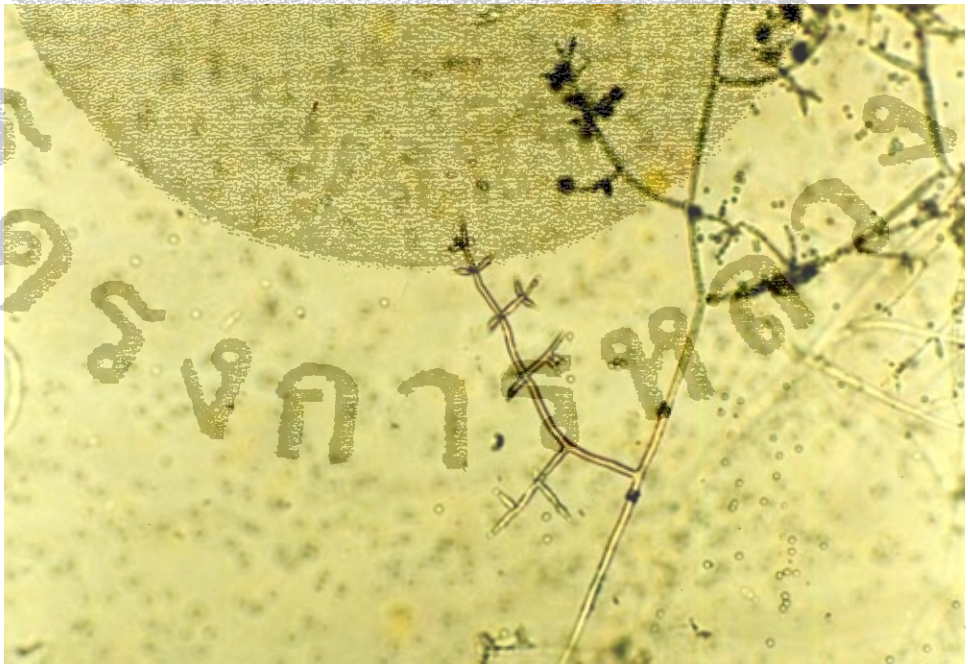


ภาพที่ 8 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14) บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน



ภาพที่ 9 ลักษณะ conidiophore (a), phialide (b) และ conidia (c) ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (ไอโซเลท CMU 2000-14) (x400)

ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000-16) บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน



ภาพที่ 11 ลักษณะ conidiophore (a), phialide (b) และ conidia (c) ของเชื้อรา *Trichoderma hamutum* (ไอโซเลท CMU2000-16) (x400)

4.2.2 การแยกจุลินทรีย์จากใบสตรอเบอรี่

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผิวใบของสตรอเบอรี่ที่นำมาจากแปลงเกษตรกรในอำเภอสะเมิงและอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร NA พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายน้ำล้างใบสตรอเบอรี่ 10^{-5} , 10^{-6} และ 10^{-7} เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) โดยพบว่ามีเพียงแบคทีเรียเท่านั้นที่เจริญจากการย้ายเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 18 ไอโซเลท

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิดร่วมกันบนอาหาร NA โดยวิธี Dual Culture Technique พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 4 ชนิดได้ดีแตกต่างกัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ (ตารางที่ 1) โดยพบว่าไอโซเลทที่สามารถยังยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CMU b2000–1 และไอโซเลท CMU b2000–6 ซึ่งมีลักษณะดังนี้

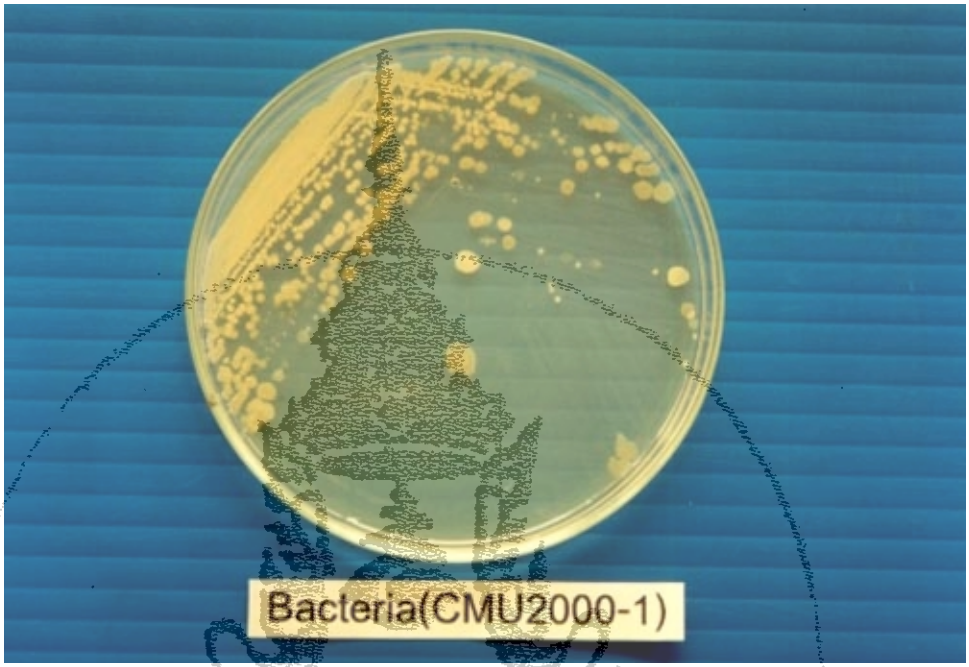
แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMU b2000–1 และ CMU b2000–6 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏโคโลนีสีครีม รูปร่างไม่แน่นอนขอบของโคโลนีมีลักษณะหยัก (ภาพที่ 12 และภาพที่ 13) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ลักษณะเป็นท่อน (rod shape) ขนาดประมาณ 1.0 – 1.2 x 3.0 – 3.5 ไมครอนหัวท้ายลักษณะเป็นเหลี่ยมเรียงต่อกัน เมื่อย้อมสีด้วยวิธีแกรม พบว่าเป็นแกรมบวก (ภาพที่ 14 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual Culture Technique

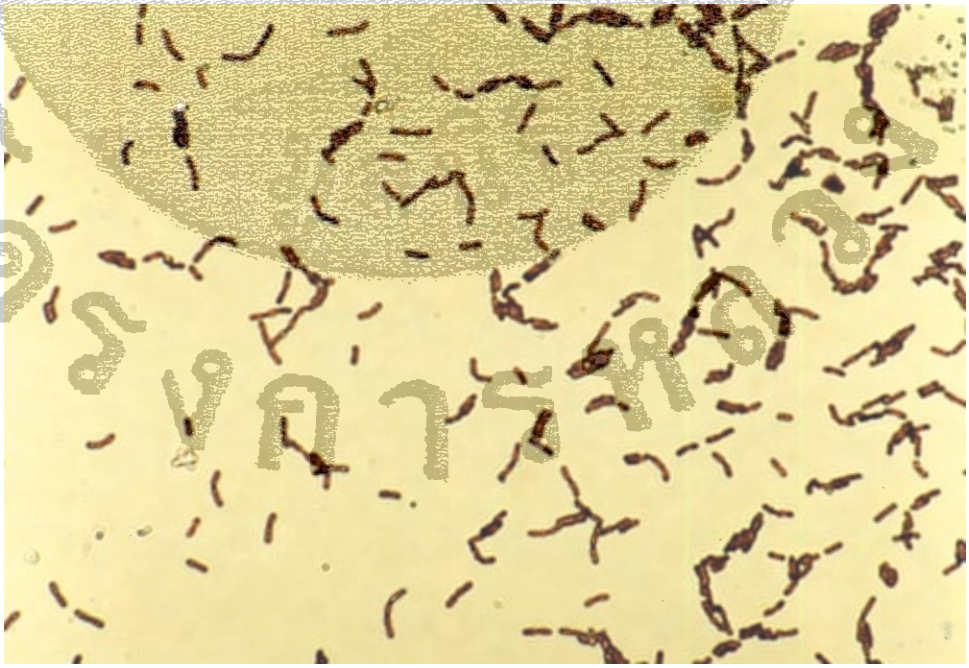
กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ[1]			
	Rhizoctonia sp.	*Fusarium* sp.	*Colletotrichum* sp.	*Phomopsis obscurans*
ไอโซเลท CMU b2000-6	25.28de[2]	40.50a	42.10a	48.71a
ไอโซเลท CMU b2000-1	38.46a	37.97b	40.78a	44.78a
ไอโซเลท CMU b2000-17	26.66cd	17.72h	34.21bc	33.33fghi
ไอโซเลท CMU b2000-14	31.53b	35.44b	32.89bc	38.46cd
ไอโซเลท CMU b2000-18	29.12bc	28.13d	30.15d	27.53klm
ไอโซเลท CMU b2000-3	21.80ef	35.44b	19.73f	37.17de
ไอโซเลท CMU b2000-10	20.15fghi	21.52g	35.52b	32.05ghij
ไอโซเลท CMU b2000-12	20.15fghi	26.58de	23.15ef	35.85def
ไอโซเลท CMU b2000-15	20.51fgh	24.14f	27.63d	33.65fgh
ไอโซเลท CMU b2000-5	14.10k	30.37c	14.47hi	37.17de
ไอโซเลท CMU b2000-9	18.34fghij	25.31ef	13.15ij	37.17de
ไอโซเลท CMU b2000-2	10.25l	26.58de	25.00c	25.64m
ไอโซเลท CMU b2000-8	17.94fghij	14.92i	14.47hi	41.02b
ไอโซเลท CMU b2000-4	20.51fgh	20.25g	22.36ef	21.79n
ไอโซเลท CMU b2000-16	14.10k	15.18i	22.36ef	30.76hijk
ไอโซเลท CMU b2000-7	21.79efg	10.12j	17.10g	34.61efg
ไอโซเลท CMU b2000-11	14.10k	17.72h	11.84ijk	29.48jkl
ไอโซเลท CMU b2000-13	7.00m	10.12j	10.52k	25.64m
CV %	13.44	9.38	10.96	7.52

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

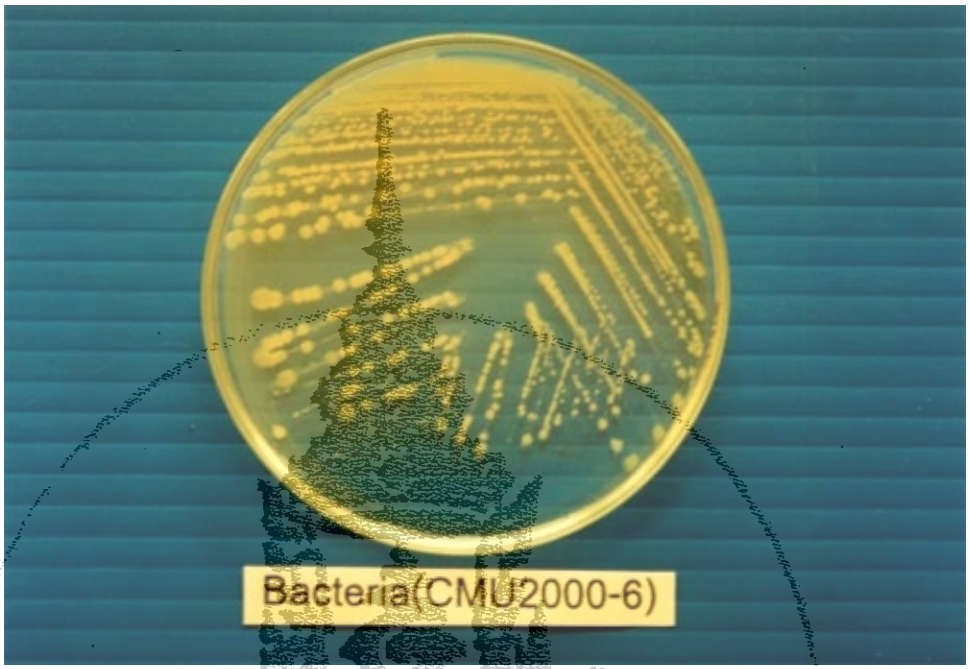
[2] ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



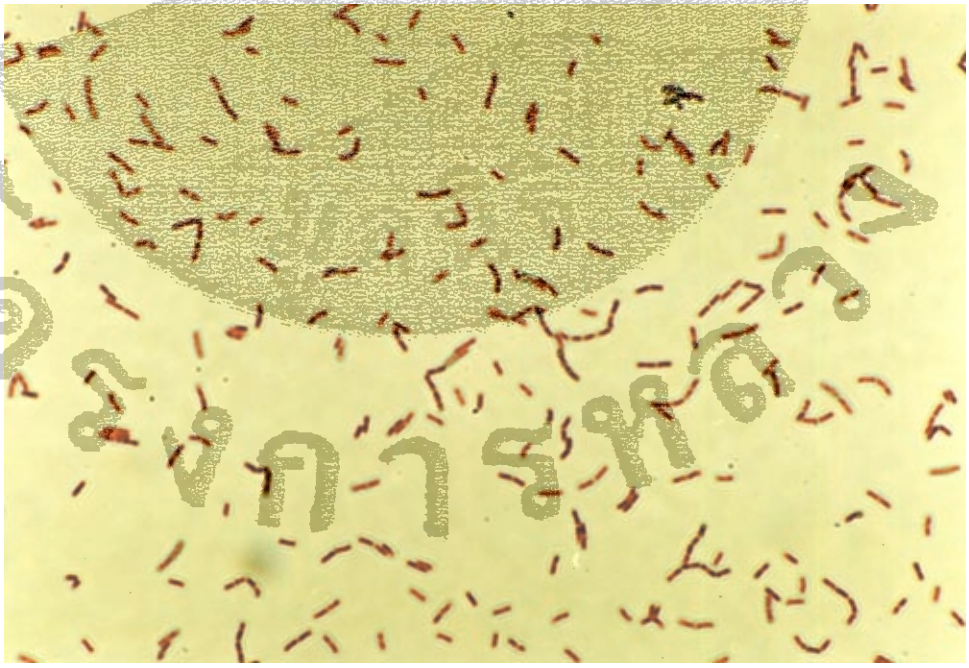
ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000–1 บนอาหาร NA อายุ 2 วัน



ภาพที่ 13 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000–1 (x400)



ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000–6 บนอาหาร NA อายุ 2 วัน



ภาพที่ 15 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000-6 (x400)

4.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่

4.3.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานก

จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดตานก พบว่าราปฏิปักษ์ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000–9) ให้ผลการยับยั้งสูงสุดคือ 39.15% แตกต่างจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ *T. harzianum* (ไอโซเลท CMU2000–14) (35.99 %), *T. hamatum* (ไอโซเลท CMU 2000–16) (32.48 %), แบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000–6 (27.14 %) และไอโซเลท CMU b2000–1 (22.57 %) ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 16 และภาพที่ 17)

4.3.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิส

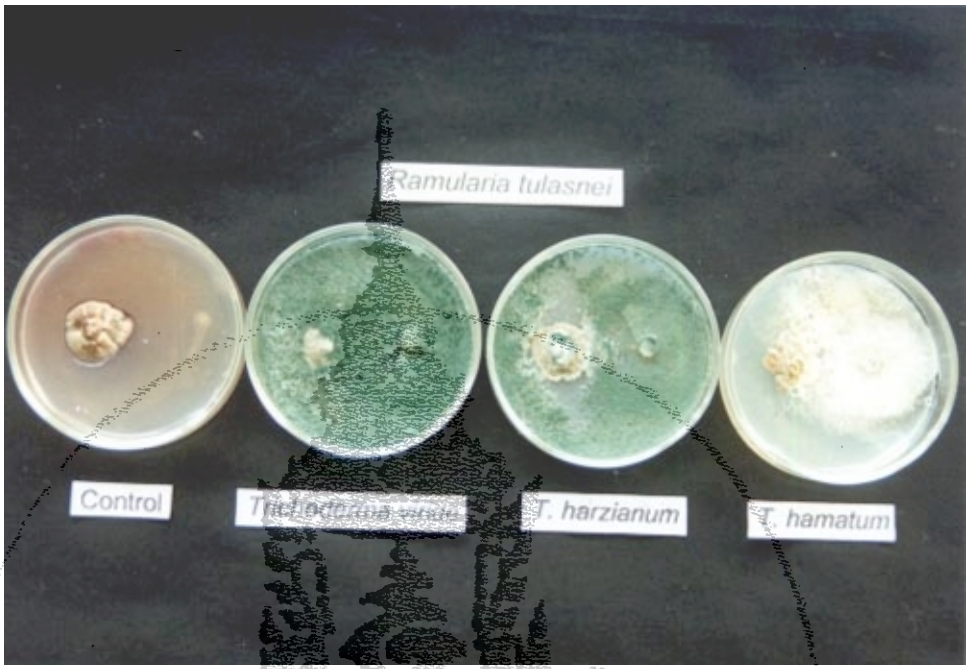
จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิส พบว่าราปฏิปักษ์ *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000–9) ให้ผลการยับยั้งสูงสุดคือ 54.84% แตกต่างจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ *T. harzianum* (ไอโซเลท CMU2000–14) (51.94 %), *T. hamatum* (49.59 %), แบคทีเรียไอโซเลท CMU b2000–6 (46.29%) และไอโซเลท CMU b2000–1 (39.41 %) ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 18 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* และเชื้อรา *Phomopsis obscurans* สาเหตุโรคใบจุดตานกและโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ โดยเรียงลำดับจากเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงสุด

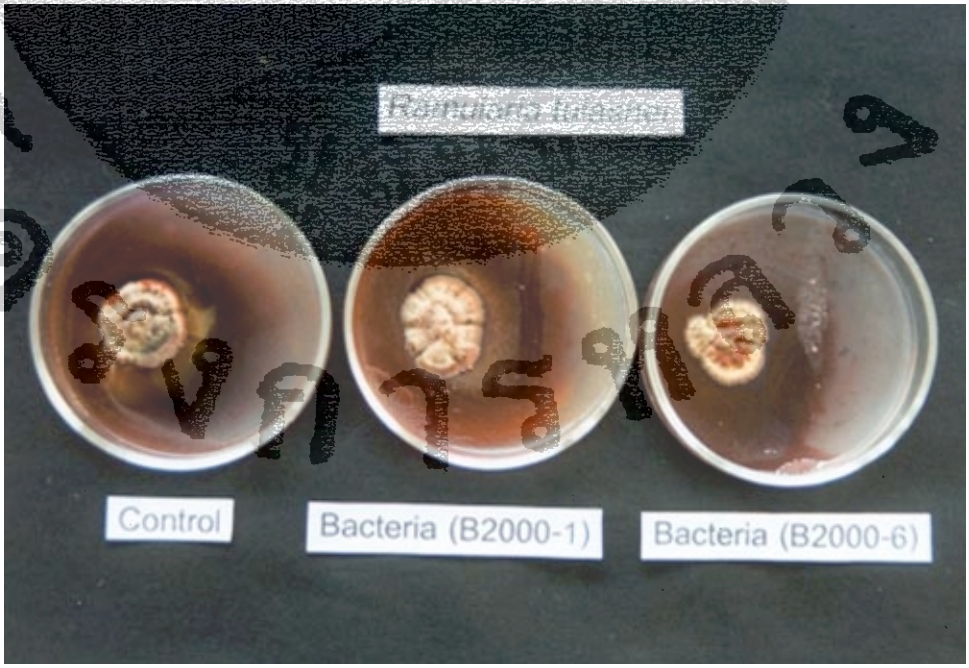
กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ[1]	
	Ramularia tulasnei	*Phomopsis obscurans*
Trichoderma viride (ไอโซเลท CMU2000-9)	39.15a[2]	54.84a
T. harzianum (ไอโซเลท CMU2000-14)	35.99ab	51.94ab
T. hamatum (ไอโซเลท CMU2000-16)	32.48b	49.59b
แบคทีเรีย (ไอโซเลท CMU b2000-6)	27.14c	46.29c
แบคทีเรีย (ไอโซเลท CMU b2000-1)	22.57d	39.41c
CV %	13.33	5.78

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น ในแต่ละกรรมวิธี

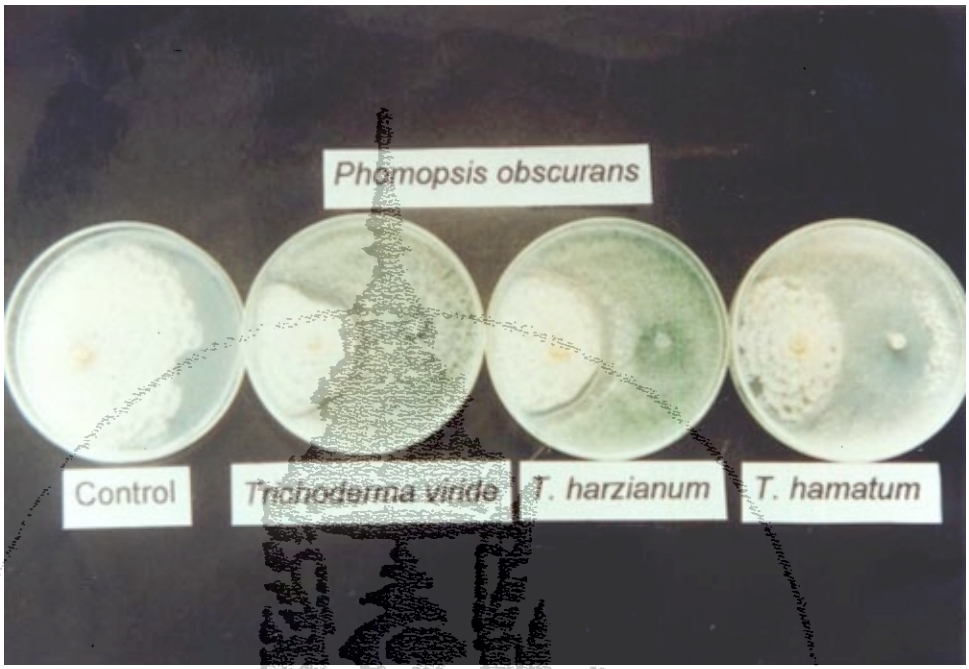
[2] ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* สาเหตุโรคใบจุดตานกของสตรอเบอรี่ บนอาหาร PDA อายุ 14 วัน



ภาพที่ 17 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rumularia tulasnei* สาเหตุโรคใบจุดตานกของสตรอเบอรี่ บนอาหาร PDA อายุ 14 วัน

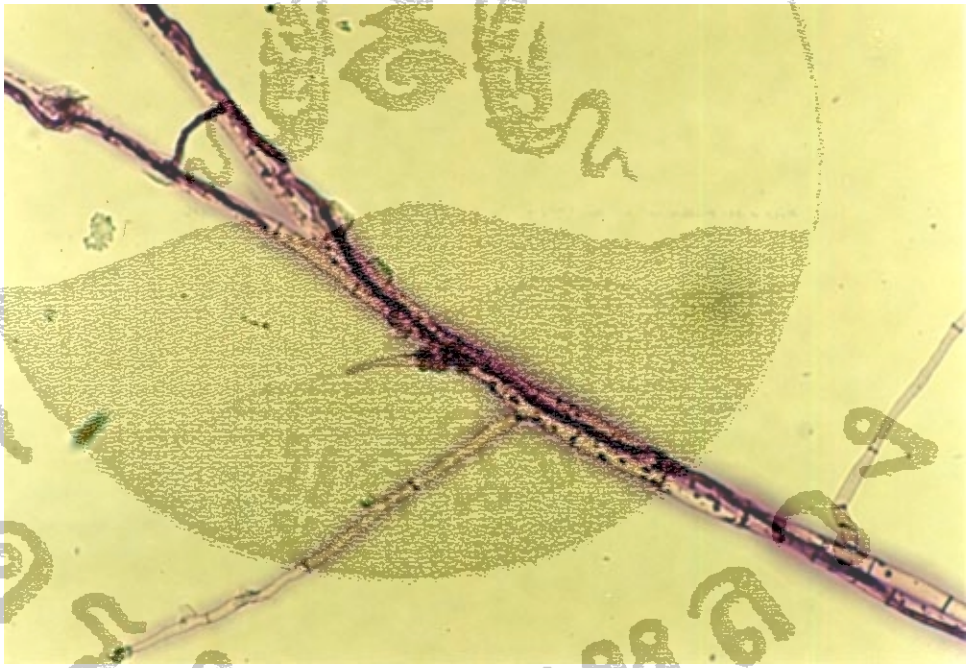


ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* สาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

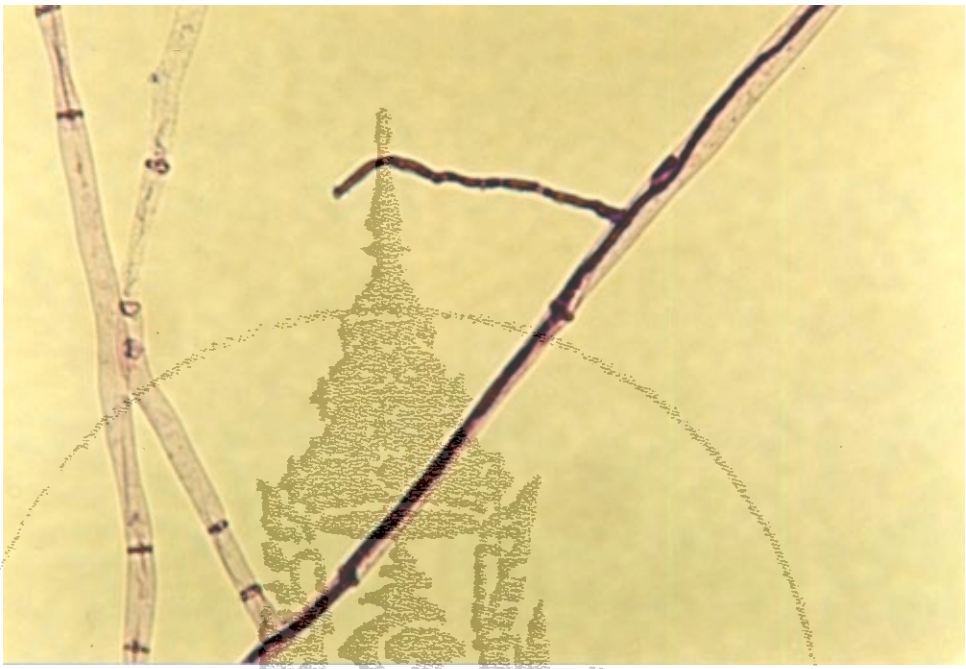
ภาพที่ 19 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* สาเหตุโรคใบไหม้โฟมอพซิสของสตรอเบอรี่ บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

4.4 การศึกษาการเป็นปรสิตของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุร่วมกันบนอาหาร PDA โดยวิธี Dual Slide Culture และ Vernal Slide Culture ระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000–9) เส้นใยขนาดเล็กสีเข้ม มีการเจริญและแทงทะลุเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *Ramularia tulasnei* ซึ่งเส้นใยขนาดใหญ่สีจางกว่า ทำให้เส้นใยของราสาเหตุแฟบลง (ภาพที่ 20) และพบว่า เชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000-9) เส้นใยขนาดเล็กสีเข้ม มีการเจริญและแทงทะลุเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *Phomopsis obscurans* ซึ่งเส้นใยขนาดใหญ่สีจาง ทำให้เส้นใยของราสาเหตุแฟบลง (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 20 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000-9) ขนาดเล็กและสีเข้ม (ศรชี้ a) เจริญอยู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *Ramularia tulasnei* ขนาดใหญ่สีจาง (ศรชี้ b) ที่ย้อมสีด้วย cotton blue ใน lactophenol (x400)



ภาพที่ 21 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma viride* (ไอโซเลท CMU2000-9) ขนาดเล็กสีเข้ม (ศรชี้ a) เจริญอยู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *Phomopsis obscurans* ขนาดใหญ่สีจาง (ศรชี้ b) ที่ย้อมสีด้วย crystal violet 0.3 % (x400)

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 เมื่อมีอายุ 21 วัน จะเริ่มพบโครงสร้าง pycnidia ปรากฏบนอาหาร ซึ่งจะพบมากในบริเวณที่ใกล้กับตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ การพบ pycnidia บน PDA จำนวนมาก เป็นไปในทำนองเดียวกับผลงานของ Maas (1998) ที่ได้รายงานไว้

ในการแยกราปฏิปักษ์จากดิน และแยกจุลินทรีย์จากใบสตรอเบอรี่ ได้นำตัวอย่างดินและใบสตรอเบอรี่จากแปลงปลูกของเกษตรกรในอำเภอสะเมิง และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ **การแยกราปฏิปักษ์จากดิน**โดยวิธี 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 สาเหตุของการแฟบของเส้นใยอาจจะมาจากการสูญเสียของเหลวภายในเส้นใยจากการดูดกินของราปฏิปักษ์ 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*

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. สตรอเบอรี่. เอกสารแนะนำที่ 106 ฝ่ายเอกสารแนะนำ กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 36 หน้า.

กาญจนา วิชิตตระกูล. 2539. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา Trichoderma 12 ไอโซเลทในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช. การค้นคว้าอิสระตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 31 หน้า.

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. 2542. การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 97 หน้า.

เกษม สร้อยทอง. 2532 ก. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

เกษม สร้อยทอง. 2532 ข. คู่มือปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 104 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 185 หน้า.

ชูพงษ์ สุกุมลนันท์. 2530. สตรอเบอรี่. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 216 หน้า.

บรรเจิด อินหว่าง. 2530. การควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* kuhn. โดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากดินเกษตรกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 150 หน้า.

พัชรินทร์ เก่งกาจ. 2540. การควบคุมโรคเหี่ยวของสตรอเบอรี่ที่เกิดจากเชื้อราไรซอคโทเนียโดยชีววิธี. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 51 หน้า.

มานะ กาญจนมณีเสถียร , อนงค์ หนูด้วง และสากล สุวลักษณ์. 2543. การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ. วารสารวิชาการเกษตร 18 (1) : 4 – 16.

ยอดชาย นิ่มรักษา. 2543. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด. การค้นคว้าอิสระตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 42 หน้า.

วรรณวิภา มรรยาวุฒิ. 2532. การศึกษาโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Ramularia tulasnei* ของสตรอเบอรี่ และการทดสอบสารเคมีในการควบคุมโรค. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 45 หน้า.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2540. การจัดการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 141 หน้า.

Ahmad, J.A. and R. Baker. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma hazianum.* Phytopathology 77 : 182 –189.

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. W.H. Freeman, San Francisco. 430 p.

Belanger, R.R., N. Durour., J. Caron., and N. Benhmou. 1995. Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Biocontrol Science and Technology 5 : 41 – 43.

Broadbent, P., K.F. Baker. and Y. Water worth. 1971. Bacteria and Actinomycetes antagonistic to fungal root pathogen in Australian soils. Australian Journal of Biological Science, 24 : 925 – 944.

Broadbent, P., K.F. Baker., N. Frank. and J. Holland. 1977. Effect of *Bacillus* spp. an increased growth of seedling in stremed and in nontreated soil. Phytopathology 67 : 1027-1034.

Elad, Y., I. Chet. and J. katan. 1980. *Trichoderma harzianum* biocontrol agents effective against *Sclerotium roffsii* and *Rhizoctonia solani* Phytopathology 70 : 119 – 121.

Fravel, D.R. and J.R, Spurr. 1971. Biocontrol of tobacco brown – spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controled environment. Phytopathology 67 : 930 – 932.

Mass, J.L. 1998. Compendium of Strawberry Diseases. The American Pythopathological Society. St.Pual, Minnesota 5521 – 2097, USA. 98 p.

Sutton, J.C. and G. Peng. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. Phytopathology 83 : 615 – 621.

Tronsmo, A, and J. Rao. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. Pathopathologische Zeitschrift 89 : 216 – 220.