

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้า
สาเหตุจากเชื้อ *Pseudocercospora dendrobii*

**Application of Antagonistic Microorganisms for the Biocontrol of Yellow
Leaf Blotch on Vandaceous Orchid Caused by *Pseudocercospora dendrobii***

ณัฐวดี คงแรม^{1/} วรณวิไล อินทนู^{1/*}
Natthawadee Kongraem^{1/} Wanwilai Intanoo^{1/*}

Received 12 Jun. 2023/Revised 25 Jul. 2023/Accepted 31 Jul. 2023

ABSTRACT

The efficacy of cell suspensions and culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus* and spore suspensions of *Trichoderma asperellum* strain CB-Pin-01 were tested in inhibiting spore germination of *Pseudocercospora dendrobii*, the causal agent of yellow leaf blotch on Vanda orchids at 24 hrs. The result showed that the antagonistic microorganisms were able to inhibit the germination of *P. dendrobii* spores by 85.38 - 99.74% and shorten the germ tube growth compared to the control treatment. Spore suspension of *T. asperellum* strain CB-Pin-01 and cell suspension of *B. amyloliquefaciens* were the most effective in inhibiting germ tube germination at 99.74% and 99.30% while germination inhibition percentages of culture filtrate of *B. cereus*, *T. asperellum* strain CB-Pin-01, *B. amyloliquefaciens* and *B. cereus* cell were 95.13, 89.83, 86.61 and 85.38%, respectively. Spraying of the 3 antagonistic microorganisms on diseased orchid leaves during the rainy season resulted in significant reduction of disease incidence 7 days after the application compared to the control treatment. *B. cereus* contributed to the smallest lesion size of 0.01 mm, followed by *B. amyloliquefaciens* of which lesion size was 1.34 mm, while the size of the lesion in the control treatment was 8 mm. Treatments of folpet and *T. asperellum* strain CB-Pin-01 showed the lesion sizes of 5.34 and 3.34 mm, respectively.

Keywords: yellow leaf blotch disease, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma asperellum* strain CB-Pin-01, biological control

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/}Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* เพื่อควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ ในสภาพแปลงเกษตรกรโดยทดสอบประสิทธิภาพของ เชลล์แชนลอย และสารกรองของเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus* และสปอร์แชนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในการยับยั้ง การออกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* สาเหตุ โรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้าในห้อง ปฏิบัติการ จากนั้น จึงทดสอบความสามารถของ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลือง ในสภาพแปลง ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการ หลังการทดสอบที่ 24 ชม. พบว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ได้ 85.38 - 99.74% ทำให้การเจริญของ germ tube สั้นผิดไปจากปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสปอร์แชนลอยของเชื้อ *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ เชลล์ แชนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก germ tube ได้ดีที่สุด 99.74 และ 99.30% ตามลำดับ รองลงมาคือ สารกรองของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ เชลล์ แชนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* โดยมี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก 95.13, 89.83, 86.61 และ 85.38% ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบใน สภาพแปลงพบว่า การพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดบนใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคแล้วในช่วงฤดูฝน สามารถลดการเกิดโรคได้ในช่วงเวลา 7 วัน หลังการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้อย่างมีนัย สำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดย

เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ทำให้ขนาดของแผล ขยายน้อยที่สุดเพียง 0.01 มม. รองลงมาคือ *B. amyloliquefaciens* ที่มีแผลขยายขนาด 1.34 มม. ในขณะที่ขนาดของแผลในกรรมวิธี ควบคุมขยายเพิ่มขึ้น 8 มม. ส่วนการใช้สารเคมี folpet และเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 พบว่า แผลขยายขนาดเพิ่มขึ้น 5.34 และ 3.34 มม. ตามลำดับ

คำสำคัญ: โรคใบปื้นเหลือง, การควบคุมโดยชีววิธี, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชที่ส่งออกได้ทั้งการตัดดอกและขายทั้งต้น โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ คือ จันทบุรี สมุทรสาคร กรุงเทพฯ ราชบุรี กาญจนบุรี และนนทบุรี ในปี พ.ศ.2564 ประเทศไทยมีผลผลิตของกล้วยไม้ 33,729 ตัน พื้นที่เก็บเกี่ยว 18,996 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) กล้วยไม้สกุลแวนด้า เป็นกล้วยไม้ที่ต้องการการดูแลเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด เนื่องจาก ดูแลค่อนข้างยาก หากสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ความหนาแน่นของต้นกล้วยไม้มากเกินไป หรือได้รับการดูแลที่ไม่ทั่วถึง จะทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้ง่าย สร้างความเสียหายโดยส่งผลให้คุณภาพลดลง โรคในกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่พบมากที่สุด คือ โรคใบปื้นเหลือง (yellow leaf blotch) อาการของโรคพบบริเวณใบล่าง เป็นจุดกลมสีเหลืองทั้งด้านบนใบและด้านใต้ใบ จุดสีเหลืองจะค่อย ๆ ขยายขนาดเป็นปื้นเหลืองใหญ่ขึ้น เมื่ออาการรุนแรงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทำให้ในเวลาต่อมาใบจะค่อย ๆ ร่วงหลุดจากต้น โรคใบปื้นเหลืองระบาดมากในช่วงฤดูฝนจนถึงฤดูหนาว สาเหตุเกิด

จากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* โดยเชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายไปกับลมและน้ำได้ดี (สมศักดิ์, 2540)

ปัจจุบันเกษตรกรมักใช้วิธีป้องกันกำจัดโรคใบปื้นเหลืองโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น mancozeb, benomyl และ carbendazim เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2543) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและได้ผลดี แต่การใช้สารเคมีต่อเนื่องเป็นเวลานานและใช้อย่างไม่เหมาะสม อาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดความต้านทาน (Briere *et al.*, 2001) ทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ และยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรในอนาคต การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและควบคุมโรคที่ปลอดภัยกว่า เพื่อลดการใช้สารเคมีและเพิ่มทางเลือกให้กับเกษตรกร การศึกษาค้นคว้าวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. dendrobii* และควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อ *P. dendrobii* และการพิสูจน์โรคสาเหตุโรคใบปื้นเหลืองบนใบกล้วยไม้สกุลแวนด้า

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่แสดงอาการเป็นโรคใบปื้นเหลือง นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณที่เป็นโรคต่อเนื่องกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 ซม. แช่ใน sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้น นำชิ้นพืชที่ได้วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 4 ชิ้น

ปมเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืช ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราวางบนอาหาร PDA, V8® juice agar (El-Gholl *et al.*, 1982) และ malt extract agar (MEA) (Crous, 2013) เก็บเชื้อบริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงไว้ในหลอดอาหาร (slant MEA) ที่อุณหภูมิ 10° ซ. พิสูจน์โรคโดยเตรียมต้นกล้วยไม้สกุลแวนด้า (จูเนียร์ลู R-002) อายุ 4 ปี จำนวน 3 ต้น นำมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบ โดยพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วทั้งต้นแล้วปล่อยให้แห้ง คลุมต้นกล้วยไม้ด้วยถุงพลาสติกใส ขนาด 30 x 45 ซม. พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *P. dendrobii* ความเข้มข้น 10⁴ สปอร์/มล. ทางปลายถุงที่เปิดไว้ พ่นลงบนใบในช่วงเย็น ปิดช่องเปิดปลายถุงโดยใช้เชือกมัด แล้วปมไว้ 24 ชม.

2. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus* และเชื้อรา *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspensions) และสารกรอง (culture filtrate) ของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. cereus* ดัดแปลงมาจาก พรามาส (2550) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) ปริมาตร 50 มล. นำไปเพิ่มจำนวนเซลล์บนเครื่องเขย่าสาร (shaker) ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา

36 ซม. จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยวัดค่าความ ชุ่นของเซลล์ optical density (OD) ที่ 0.2 (10^8 สปอร์/มล.) และเตรียมสารกรอง (culture filtrate) โดยนำเซลล์แขวนลอยที่ปรับปริมาตรความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มล. ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4° C. เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำของเหลวที่ได้กรอง ผ่าน membrane filter ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร

เตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ดัดแปลงมาจาก กรพินธุ์ (2551) โดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ชูดและล้างสปอร์ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ตรวจนับ ปริมาณเชื้อด้วย haemocytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^6 สปอร์/มล. เตรียมสารกรอง (culture filtrate) ของเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borer เจาะชิ้นรุ้น จำนวน 5 ชิ้น ไปเลี้ยงใน potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มล. นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน นำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำมาทดสอบ

2.2 การเตรียมเชื้อรา *P. dendrobii*

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ ของโรคใบปื้นเหลือง จากข้อ 1 มาปรับความเข้มข้น ให้ได้ปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *P. dendrobii* 10^4 สปอร์/มล. ด้วย haemocytometer

2.3 ทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii*

ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยการหยดสารกรอง หรือ เซลล์แขวนลอย ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ลงในสไลด์หลุม (depression slide) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ในกล่องพลาสติกขึ้น เป็นเวลา 24 ชม. นำสไลด์ มาย้อมด้วยสี acid fushin ก่อนนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกของสปอร์เชื้อ รา *P. dendrobii* และวัดความยาวของ germ tube โดยวัดและนับ 5 สปอร์/สไลด์ จำนวน 4 ซ้ำ/กรรมวิธี ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่า เชื้อแทนจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เปรียบเทียบกับสารเคมี folpet (80% WG) ทะเบียนวัตถุอันตรายเลขที่ : 186 ปี พ.ศ. 2555 ที่ความเข้มข้น 12,000 มก./กก. (Frevel and Spurr, 1977) ทำการทดสอบ ทั้งหมด 8 กรรมวิธี ได้แก่

- กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (น้ำ) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 2 *T. asperellum* CB-Pin-01 (สปอร์แขวนลอย) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 3 *T. asperellum* CB-Pin-01 (สารกรอง) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 4 *B. amyloliquefaciens* (เซลล์แขวนลอย) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 5 *B. amyloliquefaciens* (สารกรอง) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 6 *B. cereus* (เซลล์แขวนลอย) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 7 *B. cereus* (สารกรอง) x *P. dendrobii*
- กรรมวิธีที่ 8 สารเคมี folpet (12,000 มก./กก.) x *P. dendrobii*

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม R (R-language and environment for statistical computing and graphics) เปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี least significant difference

test (LSD) ($P \leq 0.05$) (R Core Team, 2014) บันทึกผลการทดลองโดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการงอกของ germ tube จากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

โดยที่ R1 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ germ tube ของเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุม

R2 คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ germ tube ของเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีทดสอบ

3. การทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ ปฏิภักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลือง สาเหตุ จากเชื้อรา *P. dendrobii* บนใบกล้วยไม้ใน สภาพแปลงปลูก

เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. cereus* ที่อยู่ในรูป
ชีวภัณฑ์ชนิดผง ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์
10⁸ สปอร์/ก. อัตรา 20 ก./น้ำ 1 ล. บ่มเชื้อเป็นเวลา
48 ชม. ก่อนนำไปใช้ เตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อ
รา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 จาก
ชีวภัณฑ์สูตรน้ำเข้มข้น 1 ปริมาณความเข้มข้นของ
สปอร์ 10⁸ สปอร์/ก. อัตรา 250 มล./น้ำ 100 ล.
เตรียมสารเคมี folpet (80% WG) อัตรา 20 ก./น้ำ

20 ล. ผสมกับสารจับใบอัตราส่วน 10 มล./น้ำ 20 ล.
ก่อนพ่น คัดเลือกต้นกล้วยไม้ที่ปลูกในเรือนปลูก
กล้วยไม้ที่คลุมด้วยตาข่ายพลาสติกสีดำพรางแสง
50% เลือกต้นที่มีลักษณะอาการโรคใบปื้นเหลือง
จำนวนซ้ำละ 3 ต้น ต้นละ 3 ใบ วัดขนาดความ
กว้างของแผลก่อนพ่นจุลินทรีย์ปฏิภักษ์ จากนั้น
พ่นจุลินทรีย์ปฏิภักษ์ที่เตรียมไว้ บริเวณบนใบและใต้ใบ
ของต้นกล้วยไม้ สกุดแวนดำ (จุเนียร์บลู R-002)
โดยพ่นจุลินทรีย์ปฏิภักษ์ในช่วงเวลาเช้าทุก 7 วัน
จำนวน 4 ครั้ง วัดขนาดความกว้างของแผลก่อนพ่น
และหลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิภักษ์ที่ 7 14 21 และ 28 วัน
การทดลองประกอบไปด้วย 5 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ
ได้แก่

- กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม ต้นที่เป็นโรคใบปื้นเหลือง + พ่นน้ำเปล่า
- กรรมวิธีที่ 2 ต้นที่เป็นโรคใบปื้นเหลือง + พ่นเชื้อรา *T. asperellum* CB-Pin-01
- กรรมวิธีที่ 3 ต้นที่เป็นโรคใบปื้นเหลือง + พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens*
- กรรมวิธีที่ 4 ต้นที่เป็นโรคใบปื้นเหลือง + พ่นเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*
- กรรมวิธีที่ 5 ต้นที่เป็นโรคใบปื้นเหลือง + พ่นสารเคมี folpet (12,000 ppm)

บันทึกผลการทดลอง วัดขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางแผลเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม R
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ $P \leq 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อรา *P. dendrobii* และการพิสูจน์ โรคสาเหตุโรคใบปื้นเหลืองบนใบกล้วยไม้สกุล แวนด้า

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบปื้นเหลือง
บนใบกล้วยไม้ พบว่า เชื้อราที่แยกได้มีการเจริญ
ของเส้นใยในช่วงแรกเป็นสีขาว เมื่อเวลาผ่านไป

20 วัน จึงเห็นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาปนเขียว
มะกอก พูเล็กน้อย เส้นใยค่อนข้างละเอียด การ
เจริญของโคโลนีค่อนข้างช้า เมื่อตรวจสอบภายใต้
กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ที่ 15
วัน เริ่มมีการสร้าง conidia ลักษณะใสไม่มีสี รูป
ร่างทรงกระบอก ค่อนข้างตรง ปลายมน กว้าง
ประมาณ 1.4 – 4 ไมครอน ยาวประมาณ 12 – 75
ไมครอน มีผนังกั้น (septum) conidium เกิดบน
ก้าน conidiophore ที่อัดแน่น (fascicle) สีน้ำตาล
ปนเขียวมะกอก ลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย
(Figure 1) ซึ่งลักษณะและขนาดดังกล่าวใกล้เคียง
กับลักษณะของเชื้อรา *P. dendrobii* รายงานของ

Deighton (1983) ที่พบว่า ลักษณะของ conidia มีรูปร่างคล้ายเข็ม (acicular) กระบองหัวกลับ (obclavate) หรือ ทรงกระบอก (cylindrical) มี septum กัน สอดคล้องกับ Sontirat *et al.* (1980) รายงานว่า ลักษณะของก้าน conidiophore อัดแน่น (fascicle) สีนํ้าตาลปนสีเขียวมะกอก มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) โดยจะพบทั้งที่มีลักษณะตั้งตรง หรือโค้งงอ จากการพิสูจน์โรค พบว่า อาการของโรคหลังการปลูกเชื้อรา

P. dendrobii ที่ 21 วัน ใบเริ่มมีสปอร์สีดำขึ้นที่บริเวณใต้ใบ และเริ่มเห็นเป็นจุดสีเหลือง พบได้ทั้งบนใบและใต้ใบ ซึ่งสอดคล้องกับ สมศักดิ์ (2540) ที่กล่าวว่า ลักษณะอาการของโรคใบปื้นเหลืองใบแสดงอาการเป็นจุดสีเหลือง พบได้ทั้งบนใบและใต้ใบ พบ chlorotic halo จากจุดเล็กแล้วขยายใหญ่ 2 - 30 มม. ต่อมาแผลอาจขยายติดกันจนทั่วทั้งใบ

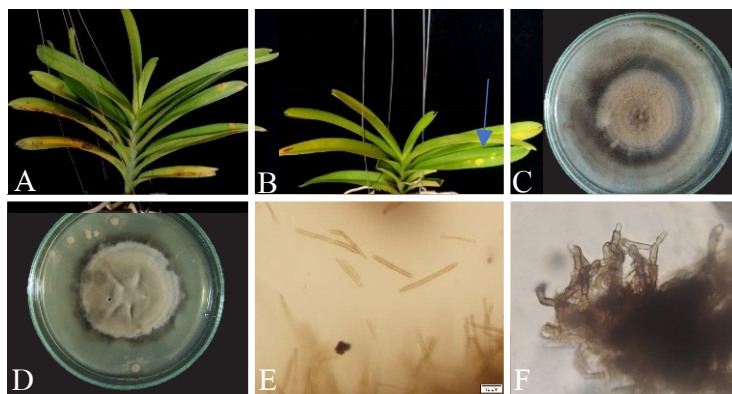


Figure 1 Symptoms of the collected specimens (A), symptoms after inoculation at 21 days (B), morphological characteristics of the colony on V8® juice agar (C), malt extract agar (D), conidia at 1000x magnification (E), and fascicle of conidiophores (F) of *Pseudocercospora dendrobii*

2. ความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ประสิทธิภาพของสปอร์หรือเซลล์แขวนลอย และสารกรองของเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. cereus* ที่ 24 ชม. พบว่า สามารถยับยั้งการงอก germ tube ของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก germ tube ได้ดีที่สุดที่สามารถยับยั้งการงอกได้ 99.74% และ 99.30%

ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่าการใช้สารเคมี folpet (99.41%) รองลงมา คือ สารกรองของเชื้อ *B. cereus* (95.13%) สารกรองของเชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (89.83%) สารกรองของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (86.61%) และเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *B. cereus* (85.38%) ตามลำดับ (Table 1)

การใช้เซลล์หรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ยังมีชีวิตสามารถยับยั้งการงอกเป็น germ tube ของเชื้อโรคภายใน 24 ชม. ได้ดีกว่าการใช้สารกรอง เนื่องจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังคงมีการเจริญ สร้างสารหรือ metabolite ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ และยังส่งผลต่อ germ tube ที่งอกออกมาแล้วทำให้มีลักษณะที่ผิดไปจากปกติ คือ ค่อนข้างสั้นและแตกแขนงมาก (Figure 2)

Table 1 Efficacy of antagonistic organisms to inhibit spore germination and germ tube formation of fungal spores of *Pseudocercospora dendrobii*

Treatment	Length of germ tube ¹ (μm.)	Inhibition of germination ² (%)	Growth of germ tube
Control (water x <i>P. dendrobii</i>)	151.41 a ⁵	0.00	normal growth
<i>T. asperellum</i> CB-Pin-01 (CS) ³	0.40 e	99.74	slow growth, short
<i>T. asperellum</i> CB-Pin-01 (CF) ⁴	15.40 c	89.83	slow growth, short
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CS)	1.08 e	99.30	slow growth, mostly do not germinate
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CF)	20.27 bc	86.61	slow growth
<i>B. cereus</i> (CS)	22.13 b	85.38	slow growth
<i>B. cereus</i> (CF)	7.37 d	95.13	slow growth, mostly do not germinate
Folpet (12,000 mg/kg)	0.89 e	99.41	slow growth, mostly do not germinate
CV%	10.95		

Note: ¹ Mean length of the germ tube that develops into the mycelium including all mycelial branches that germinate from the spores compared with germ tube length at 24 hr.

² Percent inhibition of germination = $\left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100$, details in method

³ CS: cell suspensions

⁴ CF: culture filtrate

⁵ Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD

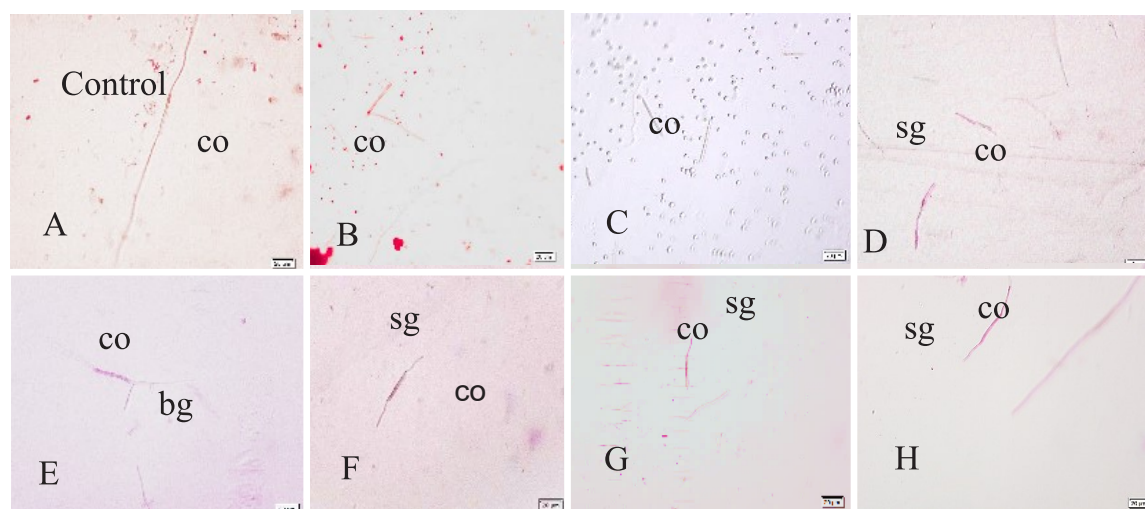


Figure 2 Spore germination of *Pseudocercospora dendrobii* after mixing antagonistic microorganism for 24 hr; Control (A), folpet (B), *Trichoderma asperellum* strain CB-Pin-01 cell suspensions (C), and culture filtrate (D), *Bacillus amyloliquefaciens* cell suspensions (E), and culture filtrate (F), and *Bacillus cereus* cell suspensions (G), and culture filtrate (H) co: conidia, sg: short germ tube, bg: branchy germ tube

ซึ่งสอดคล้องกับ กรพินธุ์ (2551) ที่รายงานว่า เชลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* สายพันธุ์ WS16 และ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. dendrobii* ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่สารกรองยับยั้งการงอกได้ 92.42 และ 96.35% ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของ Cruz-Martín *et al.*, (2020) พบว่า สารกรองของ *B. subtilis* CCIBP-M27 เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *P. fijiensis* โดยสามารถลดการงอกของ conidia และการเจริญของ mycelia ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสาร metabolites เช่น โปรตีนหรือสารเปปไทด์ จากรายงานของ Thangavelu and Mustaffa (2010) พบว่า เชื้อ *T. viride* NRCB, *T. viride*-6 และ *T. hamatum*-1 มีประสิทธิภาพในการลดการงอกของ conidia และการสร้าง mycelia ของ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* และสอดคล้องกับรายงานของ Gesnara (1994) พบว่า เชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์กลาย M35 และ M52 ผลิตสารปฏิชีวนะมายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยพบบริเวณใส (clear zone) บนอาหาร PDA

3. ความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลือง สาเหตุจากเชื้อรา *P. dendrobii* บนใบกล้วยไม้ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร

จากการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนต้นกล้วยไม้ที่แสดงอาการโรค 4 ครั้ง และวัดขนาดแผลหลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ 7 14 21 และ 28 วัน สภาพอากาศ เดือนตุลาคม 2564 ในระยะเวลาที่ทำการทดลองเป็นช่วงฤดูฝน มีความชื้นสูง อุณหภูมิเฉลี่ย ประมาณ 30 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 70% พบว่า ที่ 7 วันหลังการพ่น ทุกกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี ส่งผลให้มีขนาดของแผลน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) โดย

แผลมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น 0.01–3.34 มม. กรรมวิธีที่ใช้ *B. cereus* มีการขยายขนาดของแผลน้อยที่สุดเพียง 0.01 มม. รองลงมาคือ *B. amyloliquefaciens* มีการขยายขนาดความกว้างของแผล 1.34 มม. ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีการขยายขนาดความกว้างของแผลอยู่ที่ 8 มม. ส่วน *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีการขยายขนาดความกว้างของแผลอยู่ที่ 3.34 มม. (Figure 3)

เนื่องจาก ทำการทดลองในช่วงฤดูฝน จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางส่วนอาจถูกฝนชะล้าง ส่งผลกระทบต่อปริมาณ และประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ รวมถึงสภาพแวดล้อมก็เหมาะสมต่อการเกิดโรค เชื้อโรคแพร่กระจายเข้าสู่พืชมากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่สามารถควบคุมโรคได้ จึงพบว่าหลังจากพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ 28 ทุกกรรมวิธีเป็นโรคเพิ่มขึ้น ระดับความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ กรพินธุ์ (2551) ที่ได้ทดสอบในช่วงฤดูฝน (ก.ค.- ต.ค. 2550) เช่นกัน โดยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนใบกล้วยไม้สกุลหวายเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. dendrobii* แล้วดูแลตามปกติ พบว่า ในอีก 21 วันต่อมา กรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CG06 แต่ไม่พ่นเชื้อโรคก็เกิดโรคในระดับที่เทียบเท่ากับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นเชื้อโรค (-Pd) เช่นกัน

Table 2 Disease incidence of yellow leaf blotch disease of Vanda orchids after spraying with antagonistic microorganisms for 7, 14, 21 and 28 days

Treatment	Increased lesion size ¹ (mm.)			
	7 days	14 days	21 days	28 days
Control (water)	8.00 a ²	8.00 ab	20.67 a	35.67 a
<i>T. asperellum</i> CB-Pin-01	3.34 abc	20.33 ab	29.33 a	35.00 a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1.34 bc	22.33 a	26.67 a	40.67 a
<i>B. cereus</i>	0.01 c	15.00 ab	20.17 a	26.67 a
Folpet (80% WG)	5.34 ab	5.34 b	17.67 a	41.33 a
CV%	68.87	62.73	45.14	45.86

Note: ¹ The wound diameter of length after spraying with antagonistic microorganisms

² Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD

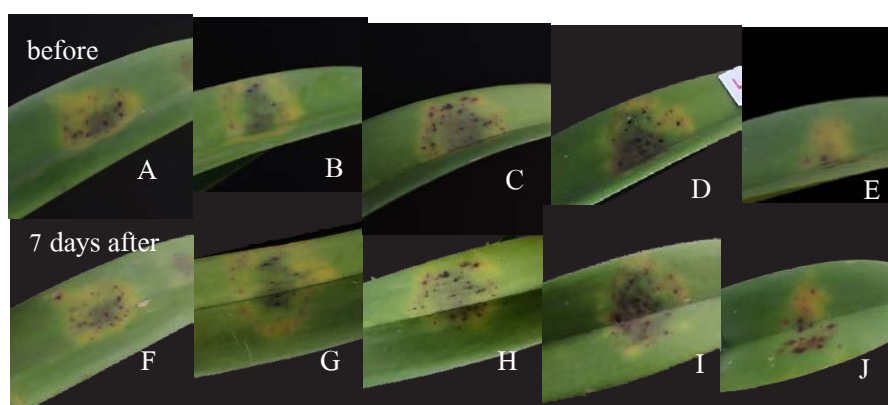


Figure 3 Disease incidence of yellow leaf blotch disease on Vanda orchids before and seven days after spraying with antagonistic microorganisms under orchid plantation conditions, Control (A and F), *Trichoderma asperellum* strain CB-Pin-01 (B and G), *Bacillus amyloliquefaciens* (C and H), *Bacillus cereus* (D and I) and folpet (E and J)

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *B. cereus* เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์การเจริญเป็น germ tube และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* สาเหตุโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้าได้ โดยสปอร์แวนด้าของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และเซลล์แวนด้าของเชื้อแบคทีเรีย *B.*

amyloliquefaciens มีประสิทธิภาพดีที่สุดเทียบเท่ากับสารเคมี folpet ในขณะที่การใช้สารกรองของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เชื้อรา *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และเซลล์แวนด้าของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ตรงลงมาตามลำดับ และการพ่นชีวภัณฑ์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* และ *T. asperellum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ให้กับ

ต้นกล้วยไม้สกุลแวนด้า (จูเนียร์พันธุ์ R-002) ที่แสดงอาการโรคใบปื้นเหลืองแล้วในช่วงเวลาเช้าทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง คือเมื่อ 7 14 21 และ 28 วัน ในช่วงฤดูฝน พบว่า ขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้ขยายออกน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในช่วง 7 วันแรกเท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่มอบทุนสนับสนุนนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเข้าศึกษาในหลักสูตร วท.ม. (โรคพืช) ปีการศึกษา 2564

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทย์ฯ ทนกล้า. 2551. การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 138 หน้า.
- กรมวิชาการเกษตร. 2543. มาตรฐานกล้วยไม้ของประเทศไทยและการผลิตกล้วยไม้อย่างถูกต้องและเหมาะสม. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 26 หน้า.
- พรวรรณ เจริญรักษ์. 2550. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบด่างของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* [Roldan] Deighton. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 123 หน้า.
- สมศักดิ์ รักไพฑูรย์สมบัติ. 2540. ปลวกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์. บริษัท ธรรมสาร จำกัด, กรุงเทพฯ. 384 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. กล้วยไม้. แหล่งข้อมูล: <https://mis-app.oae.go.th/product/>. สืบค้น: 20 เมษายน 2566.
- Briere, S.C., G.D. Franc and E.D. Derr. 2001. Fungicide sensitivity characteristics of *Cercospora beticola* isolates recovered from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska and Wyoming: 1. Benzimidazole and triphenyltin hydroxide. *Sugar Beet Res.* 38: 111-120.
- Crous, P.W., U. Braun, G.C. Hunter, M.J. Wingfield, G.J. Verkley, H.D. Shin, C. Nakashima and J. Z. Groenewald. 2013. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*. 75(1): 37-114.
- Cruz-Martín, M., E. Mena, M. Acosta-Suárez, T. Pichardo, E. Rodriguez and Y. Alvarado-Capó. 2020. Protein compounds of *Bacillus subtilis* with in vitro antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet). *Braz. J. Microbiol.* 51: 265-269.
- Deighton, F.C. 1983. Studies on *Cercospora* and allied genera. VIII. Further notes on Cercoseptoria and some new species and redispersions. *Mycol.* 151: 1-13.
- El-Gholl, N. E., S.A. Alfieri, W.H. Ridings and C.L. Schoulties. 1982. Growth and sporulation in vitro of *Cercospora apii*, *Cercospora arachodicola*, *Cercospora kikuchii* and other species of *Cercospora*. *Canad. J. Bot.* 60: 862-868.
- Frevel, D.R. and H.W. Spurr. 1977. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. *Phytopathology*. 67: 930-932.
- Gesnara, W. 1994. Study on *Trichoderma harzianum* as a potential biocontrol agent of tomato and barley disease caused by *Sclerotium rolfsii* emphasis on fermentation biomass. Ph.D. Dissertation, Kasetsart University, Thailand. 110 p.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed: June 7, 2023.
- Sontirat, P., P. Phitakpraiwan, W. Choobanroong and P. Giatgong. 1980. Plant pathogenic *Cercospora* in Thailand. Plant Pathology and Microbiology Division, Dept. of Agriculture. 51 p.
- Thangavelu, R. and M. Mustafa. 2010. A potential isolate of *Trichoderma viride* NRCB1 and its mass production for the effective management of Fusarium wilt disease in banana. *Tree F. S. B.* 4(2): 76-84.