การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

Controlling Phytophthora Root Rot and Stem Rot of Pummelo by Antagonistic Microorganism

นลินี ศิวากรณ์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์ เพลินพิศ สงสังข์

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรครากเน่าและโคนเน่าเป็นปัญหาที่สำคัญมากต่อการปลูกส้มโอโดยเฉพาะในจังหวัดสมุทรสงคราม ต้นส้มโอแสดงอาการโรคให้เห็นได้อย่างเด่นชัดบริเวณโคนต้นเหนือดินมีรอยช้ำฉ่ำน้ำ และมีน้ำยางสีน้ำตาลเข้มไหล เมื่อลอกผิวเปลือกจะพบแผลเน่าเยิ้มฉ่ำน้ำมีสีน้ำตาลเป็นทางตามลำต้นและบางครั้งเป็นลายริ้วภายในลำต้น ถ้าไม่ได้รับการรักษาหรือปล่อยให้เป็นโรคติดต่อกันนานใบจะร่วงและยืนต้นแห้งตาย จากการแยกหาเชื้อสาเหตุจากต้นที่เป็นโรคและตรวจดินในแหล่งปลูกรวมทั้งจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าโรครากเน่าและโคนเน่ามีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* เชื้อรานี้สามารถเจริญเติบโตบนอาหารPDA เส้นใยบางมีสีขาว sporangium กลมรูปไข่ขนาด 20.24-30.36 x 25.3-40.48 µ (25.63 X 33.57 µ) อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของ sporangium เป็น 1.30 ภายใน sporangium มี zoospores จำนวนมาก และถูกปล่อยออกมาทางปากเปิดด้านบน(papilla) chlamydospore รูปร่างกลมมีผนังหนาขนาด 30.36 - 40.48 µ การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จำนวน 72 ไอโซเลทต่อเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าด้วยกรรมวิธีต่างๆในห้องปฏิบัติการได้แก่ ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ(Antagonistic reaction method) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดินบ่มเชื้อโดยใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) การทดสอบการไม่ก่อให้เกิดโรคกับส้มโอของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับการคัดเลือก การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี16S rDNA sequence analysis การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งจากผลการทดลองเหล่านี้พบว่า *Bacillus subtilis* strain WD20 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถสร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต(Fungistasis**)** และฆ่าทำลาย**(**Fungicidal) และลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคราก

รหัสการทดลอง 01-10-49-02-03-02-09-51

เน่าและโคนเน่าในดิน รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ดังนั้นเชื้อ *B. subtilis* WD20 จึงถูกนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์และทดสอบในแปลงปลูกส้มโอที่เป็นโรครากเน่าและโคนเน่าในจังหวัดสมุทรสงคราม จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ทาแผลและราดดินด้วยผงเชื้อ *B. subtilis* WD20 และกรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ทาแผลและราดดินด้วยน้ำหมักจากเชื้อ *B. subtilis* กับกากน้ำตาล สามารถรักษาโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอได้โดยต้นส้มโอที่ทำการทดสอบหายจากการเป็นโรค แผลที่เป็นโรคจะแห้ง ไม่มีอาการยางไหลและมีเนื้อเยื่อสีเขียวเกิดขึ้นใหม่อย่างรวดเร็วภายใน 3 สัปดาห์ ภายหลังการรักษา 3 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่กลมกลืนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกันกับเนื้อยื่อเดิม ต้นส้มโอเจริญเติบโตปกติและให้ผลผลิตดีซึ่งผลการรักษาสอดคล้องกับการตรวจหาปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน จากการตรวจดินบริเวณต้นที่เป็นโรคก่อนการทดลองพบว่าปริมาณ sporangium ของเชื้อราสาเหตุโรค *P. parasitica* ในดินมีจำนวนมากมายจนไม่สามารถตรวจนับได้ และหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD20 พบว่าการราดดินด้วยผงเชื้อและการราดดินด้วยน้ำหมักผงเชื้อกับกากน้ำตาลทำให้เชื้อราสาเหตุโรค *P. parasitica* ที่อาศัยอยู่ในดินลดลงโดยเฉลี่ย 63.95% และ64.11% ตามลำดับ

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merill หรือ *C. grandis* (L.) Osbeck] จัดอยู่ในวงศ์ Rutace มีชื่อสามัญว่า pummelo (รวี,2523) พันธุ์ส้มโอที่ปลูกเพื่อการค้าแบ่งออกได้ดังนี้ พันธุ์การค้าหลัก ได้แก่ ขาวพวง ขาวทองดี ขาวน้ำผึ้ง เป็นต้น พันธุ์การค้าเฉพาะแห่ง ได้แก่ ขาวแป้น ขาวหอม ขาวแตงกวา ท่าข่อย ขาวใหญ่ หอมหาดใหญ่ เจ้าเสวย กรุ่น ขาวแก้ว เป็นต้น (ทวีศักดิ์ และ สุนิสา) ในปี 2550 ไทยส่งออกส้มโอปริมาณ 10,071 เมตริกตัน มูลค่า 119.953 ล้านบาท (นิรนาม,2550) โดยพื้นที่การปลูกส้มโอที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม จ.สมุทรสาคร จ.ราชบุรี จ.ชัยนาท เป็นต้น (ทวีศักดิ์และสุนิสา)

โรครากเน่าและโคนเน่านับเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ส้มโอโรคหนึ่ง เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasica* (Erwin and Ribeiro, 1996) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตส้มโอ เกษตรกรมีวิธีป้องกำจัดเชื้อราดังกล่าวหลายวิธี เช่น การเฉือนเปลือกไม้ส่วนที่เป็นแผลออก ทาแผลและใช้เมทาแลกซิลซึ่งเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางแต่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดช่วงสั้นๆ และยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้โรครากเน่าและโคนเน่ายังคงระบาดเหมือนเดิม ดังนั้น การควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะนำมาใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตในเนื้อเยื่อพืช ในดิน และแหล่งน้ำธรรมชาติ การป้องกันกำจัดโดยชีววิธีโดยใช้ชบวนการของจุลินทรีย์เช่น

การย่อยสลาย การครอบครองพื้นที่ และการสร้างสารปฏิชีวนะ ลักษณะที่สำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้ต้องสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้(Campbell, 1989) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าและโคนเน่าโดยไม่พึ่งสารเคมีเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นรูปธรรมได้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แหล่งปลูกส้มโอที่มีโรครากเน่าและโคนเน่าระบาด
2. ตัวอย่างโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอ, ใบส้มโอและดินปลูกจากต้นที่ไม่เป็นโรค
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ RNV, PDA, PSA, น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แอลกอฮอล์
4. กล้องจุลทัศน์ และวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. การสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอ

1.1. สำรวจแหล่งปลูกส้มโอที่มีการระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่าในจังหวัดสมุทรสงครามและจังหวัดชัยนาท บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ และเก็บตัวอย่างดินในแต่ละแหล่งปลูก

1.2. แยกเชื้อสาเหตุโรคจากต้นส้มโอที่เป็นโรคในแปลงปลูก โดยใช้มีดขูดลอกผิวเปลือกภายนอกบริเวณที่เป็นโรคทิ้ง แล้วใช้มีดที่สะอาดชุบแอลกอฮอลลนไฟฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็น จึงนำมาเฉือนเนื้อเยื่อภายในที่เป็นโรคและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2 - 3 มม. และนำไปวางบนอาหาร PDA และ RNV จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 - 4 วัน นำเส้นใยของเชื้อราสาเหตุที่แยกได้มาเลี้ยงขยายบนจานอาหาร PDA

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุที่แยกได้

2.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

1. นำ cork borer ที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาเจาะเชื้อราสาเหตุซึ่งเลี้ยงบนจานอาหารในข้อ1.2 จำนวน 5-10 ชิ้นต่อหนึ่งจานอาหาร แล้วนำเชื้อแต่ละชิ้นมาแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อที่ใส่ในจานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 2 วัน

2. จากนั้นนำเส้นใยของเชื้อสาเหตุมาเขี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโดยตรวจลักษณะและวัดขนาดของ sporangium, chlamydospores จำนวน 50 สปอร์ และหาค่าเฉลี่ย

2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในการทำให้เกิดโรค

1. ตัดชำใบส้มโอแล้วใช้สำลีพันก้านใบด้วยวิธี detached leaf technique จากนั้นนำมาวางในกล่องพลาสติกใสที่มีกระดาษฟางที่เปียกวางให้ความชื้น

2. นำ cork borer มาเจาะทำแผลบนใบส้มโอโดยทำแผลระหว่างเส้นกลางใบทั้งสองข้างๆ ละ 1 จุด

3. นำ cork borer มาเจาะเชื้อราสาเหตุที่เลี้ยงบนจานอาหารในข้อ 1.2 แล้วนำไปวางบนใบส้มโอที่ทำแผลเตรียมไว้ในข้อ 2 ข้างละ 1 ชิ้น

4. ส่วน control นำ cork borer มาเจาะอาหารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแล้วนำมาวางบนใบส้มโอที่ทำแผลในข้อ2

5. ตรวจผลการทำให้เกิดโรคบนแผลที่ปลูกเชื้อราสาเหตุและ control

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

3.1 โดยวิธีบด

1. นำใบส้มโอ มะม่วง และทุเรียนมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 1 กรัมบดกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มล.

2. เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน

3. ใช้เข็มเขี่ยหัวกลม(loop) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแตะน้ำคั้นของใบส้มโอ มะม่วง และทุเรียนที่บดในข้อ1 แล้วนำมาลากบนจานอาหารPDAที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุในข้อ2 โดยลากไปรอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุ จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน

4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการสร้างบริเวณยับยั้งรอบเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อที่ขึ้นปะปนมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยหัวกลมแตะเชื้อและนำมาเลี้ยงในหลอดอาหาร PSA

5. นำเชื้อที่คัดเลือกแล้วในข้อ4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว(single colony) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหาร PSA เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 โดยวิธีตัดชิ้นใบ

1. นำตัวอย่างใบพืชมาตัดให้มีขนาด 3-5 มม. และนำมาล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ

2. เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน

3. นำใบส้มโอในข้อ1 มาวางบนขอบจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุในข้อ 2 จานละ 4 จุด โดยวางรอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุและบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน

4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ลักษณะโคโลนีที่แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อต่างๆ ที่ขึ้นมาปะปนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีcross streak เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว(single colony) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหาร PSA เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

5. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำมาเลี้ยงในหลอดอาหารPSA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30^{0}ซ เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มผิวหน้าอาหารจึงเทพาราฟินออยล์ปิดทับ และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 ^{0}ซ

3.3 การแยกเชื้อจากดิน

1. นำตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มล.แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer

2. เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าที่แยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน

3. ใช้เข็มเขี่ยหัวกลม (loop) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแตะในสารละลายของดินในข้อ1 แล้วนำมาลากบนจานอาหารPDAที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุในข้อ2 โดยลากไปรอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน

4. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการสร้างบริเวณยับยั้งรอบเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อที่ขึ้นปะปนบนอาหาร เก็บใส่หลอดอาหาร PSA

5. นำเชื้อที่คัดเลือกแล้วในข้อ4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว(single colony) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหาร PSA เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

4. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Antagonistic reaction

4.1 เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าที่แยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน

4.2 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในหลอดอาหารPSA เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำหลอดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 9 มล.เทใส่ในหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อ ต่อมาขูดเชื้อออกจากอาหารแล้วนำมาปั่นให้เข้ากันด้วย vortex mixer

4.3 ดูดสารละลายของเชื้อในข้อ4.2 ด้วย micropipette จำนวน 1 ไมโครลิตรมาหยดบนกระดาษทดสอบ(paper disc) ที่อบฆ่าเชื้อ แล้วนำมาวางที่ขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ4.1 โดยวางให้ห่างจากขอบจานอาหารทั้ง 4 ด้านด้านละ 1.5 ซม.

4.4 ในกรรมวิธีเปรียบเทียบจะดูดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อด้วย micropipette จำนวน 1 ไมโครลิตร มาหยดบนกระดาษทดสอบที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ4.1 โดยวางให้ห่างจากขอบจานอาหารทั้ง 4 ด้านด้านละ 1.5 ซม.

4.5 นำจานอาหารในข้อ 4.3 และ 4.4 มาบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุในกรรมวิธีเปรียบเทียบเจริญเติบโตเต็มจานอาหาร

4.6 ทำการตรวจวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุ เส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และบริเวณยับยั้ง

4.7 ตรวจวิเคราะห์ สรุปผลการทดลองโดยวัดขนาดและหาค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาการยับยั้ง = $\frac{A - B}{A} \times 100$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราในกรรมวิธีเปรียบเทียบ

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราที่วางเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดเดียวกันทั้ง 4 ด้าน

5. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. parasitica* ด้วยวิธี Baiting technique

5.1 การเตรียมดินบ่มเชื้อ

เตรียมอาหาร oat meal medium โดยนำข้าวโอ๊ต 5 กรัม/น้ำ 20 มล. ใส่จานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มาเลี้ยงบนอาหาร oat meal medium ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลาประมาณ 10 วัน จากนั้นนำไปปั่นในอัตราส่วนเชื้อรา 1 จานอาหารต่อน้ำ 200 มล. และนำไปคลุกกับดิน 1 ก.ก. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง บ่มเชื้อในดิน 4 สัปดาห์

5.2 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหาร PSA โดยวิธีการstreak plate ให้เต็มจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานอาหารนำไปผสมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล.

5.3 ชั่งดินบ่มเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1 จำนวน 50 กรัม ใส่ในถ้วยพลาสติก ขนาด 12 X 12 ซม. แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2 ลงไป โดยใส่รวม 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบให้เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล. โดยไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทุกกรรมวิธีนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้อง

5.4 ตัดใบส้มโอ ขนาด 1 X 1 ซม. ลงไปจำนวน 10 ใบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วนำใบมาตรวจหา Sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ที่ติดอยู่ขอบใบทั้ง 4 ด้าน และทำเช่นเดียวกันนี้หลังจากเติมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยตรวจต่อไปอีก 2 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน

5.5 การประเมินและตรวจให้คะแนน Sporangium ที่พบ ดังนี้

ระดับ 0 = ไม่พบ sporangium

ระดับ 1 = พบ sporangium 1 – 10 sporangium/ใบ

ระดับ 2 = พบ sporangium 11 – 20 sporangium/ใบ

ระดับ 3 = พบ sporangium 21 – 30 sporangium/ใบ

ระดับ 4 = พบ sporangium มากกว่า 30 sporangium/ใบ

5.6 นำมาคำนวณวิเคราะห์เปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรค

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรค = ผลรวม(ระดับXจำนวนใบที่ baiting ในแต่ละระดับ)X100

จำนวนใบที่ baiting ทั้งหมด X ระดับสูงสุด

6. ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการก่อให้เกิดโรคกับใบส้มโอ

6.1 ตัดชำใบส้มโอแล้วใช้สำลีพันก้านใบด้วยวิธี detached leaf technique จากนั้นนำมาวางบนกระดาษฟางที่เปียกชื้นซึ่งใส่ในกล่องพลาสติกใส

6.2 นำ cork borer มาเจาะทำแผลบนใบส้มโอโดยทำแผลระหว่างเส้นกลางใบทั้งสองข้างๆ ละ 2 จุด

6.3 นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทีมีประสิทธิภาพดีจากการคัดเลือกในข้อ 5 มาเลี้ยงบนจานอาหาร PSA เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะ แล้วนำไปวางบนใบส้มโอที่ทำแผลเตรียมไว้ในข้อ 6.2 จุดละ 1 ชิ้น

6.4 ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบนำอาหารPSA ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อมาเจาะวางบนใบส้มโอที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2

6.5 ตรวจผลการทำให้เกิดโรคบนแผลที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์และกรรมวิธีเปรียบเทียบ

7. การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี 16S rDNA

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้คัดเลือกแล้วตามกรรมวิธีต่าง ๆ ในข้อ6 ไปจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี16S rDNA sequence analysis ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. parasitica*

8.1 นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์(ที่ได้คัดเลือกไว้แล้วในข้อ 6) มาเลี้ยงบนอาหารเหลว PSB และ PDB เป็นเวลา 2, 5 และ 7 วัน

8.2 นำเชื้อที่เลี้ยงในข้อ 8.1 ไปเหวี่ยงโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบ/วินาที อุณหภูมิ 20^0 ซ.

8.3 นำส่วนที่เป็นน้ำใสของเชื้อที่ผ่านเครื่องเหวี่ยงในข้อ 8.2 มากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย

8.4 นำสารสกัดจากเชื้อที่ได้ในข้อ 8.3 จำนวน 20 มล.ผสมกับอาหาร PDAที่หลอมเหลวจำนวน 80 มล.จากนั้นเทใส่จานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

8.5 นำ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม.มาเจาะเชื้อราสาเหตุที่เลี้ยงบนจานอาหารในข้อ 1.4 แล้วนำมาวางบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อในข้อ 8.4

8.6 ตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. parasitica* เมื่อเลี้ยงบนอาหารในข้อ8.5 เป็นเวลา 4, 10 และ 14 วัน

8.7 นำเชื้อราสาเหตุที่ไม่เจริญเติบโตในข้อ8.6 มาเลี้ยงบนจานอาหารPDA เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของการมีชีวิตอยู่ของเชื้อรา *P. parasitica* ภายหลังจากได้รับสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

9. การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอในแปลงปลูก อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม

9.1 การผลิตผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

9.1.1 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้คัดเลือกในข้อ6 จำนวน 1 ไอโซเลท ในอาหาร PSB และ PDB จำนวน 250 มล.ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 500 มล. และนำเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบอัตรา 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน

9.1.2 เติมแมกนีเซียมซัลเฟต ลงไปในขวดทดลองที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในข้อ 9.1.1 ต่อมาเติมเมททิลเซลลูโลสลงไป

9.1.3 นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในผงทัลคัมกวนให้เข้ากัน แล้วนำไปผึ่งไว้จนแห้งบนถาดและบดให้เป็นผง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18^0ซ.

9.2 ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอในแปลงปลูกอำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เนื่องจากเกษตรกรเจ้าของสวนขอร่วมทำการทดลองด้วยโดยขอผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 จำนวน 180 กรัมไปหมักในแต่ละสูตร โดยหมักกับกากน้ำตาลเป็นสูตรที่ 1 และหมักกับน้ำ EM เป็นสูตรที่ 2 เพื่อเป็นสูตรน้ำในการราดดินในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 ดำเนินการทดลองตามกรรมวิธีต่างๆ โดยแต่ละกรรมวิธีจะถูกนำมาใส่บนต้นส้มโอรวม 3 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ วางแผนการทดลองจำนวน 4 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้นดังนี้

1. ลอกเปลือกโคนต้นส้มโอบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตรซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตรและราดดินบริเวณโคนต้นด้วยผงเชื้ออัตรา 50 กรัม/น้ำ 5 ลิตร

2. ลอกเปลือกโคนต้นส้มโอบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตรซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตรและราดดินบริเวณโคนต้นด้วยน้ำหมักสูตรที่1 (กากน้ำตาล 1 กก. +น้ำ 25 ลิตร+ผงเชื้อ 180 กรัม)

3. ลอกเปลือกโคนต้นส้มโอบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตรซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตรและราดดินบริเวณโคนต้นด้วยน้ำหมักสูตรที่2 (น้ำหมักชีวภาพ Effective Microorganisms 100 มล. + น้ำ 5 ลิตร + ผงเชื้อ 180 กรัม)

4. ลอกเปลือกโคนต้นส้มโอบริเวณที่เป็นโรคแล้วทาด้วยผงทัลคัมที่ไม่มีเชื้ออัตรา 200 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตรซึ่งผสมสารจับใบอัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตรเพื่อให้เชื้อสาเหตุโรคสัมผัสผงทัลคัมที่ไม่มีเชื้อและราดดินบริเวณโคนต้นด้วยผงทัลคัมที่ไม่มีเชื้ออัตรา 50 กรัม/น้ำ 5 ลิตร (control) ตรวจอาการของโรคที่ปรากฏบนต้นส้มโอและบันทึกผลการรักษาในกรรมวิธีต่างๆ และก่อนการดำเนินการทดลองต้องเก็บตัวอย่างดินในทุกกรรมวิธีไปทำการตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคที่อาศัยอยู่ในดินก่อนทุกครั้ง เพื่อตรวจหาปริมาณsporangium ด้วยวิธี baiting technique ในห้องปฏิบัติการภายใต้กล้องจุลทัศน์ และประเมินให้คะแนนความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคตามการประเมินและให้คะแนนในข้อ5.5 และข้อ5.6

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553

ห้องปฏิบัติงานกลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ. กรมวิชาการเกษตร

แหล่งปลูกส้มโอของเกษตรกรในจังหวัดสมุทรสงคราม จ.ชัยนาท และจ.นครปฐม

แปลงส้มโอของเกษตรกร อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอ จากการสำรวจโรคในแหล่งปลูกส้มโอจังหวัดสมุทรสงครามพบโรครากเน่าและโคนเน่าระบาดรุนแรง ต้นส้มโอที่ปลูกในจังหวัดสมุทรสงครามจะแสดงอาการโรคให้เห็นได้อย่างเด่นชัดบริเวณโคนต้นเหนือดินมีรอยช้ำฉ่ำน้ำ และมีน้ำยางสีน้ำตาลเข้มไหล เมื่อลอกผิวเปลือกจะพบแผลเน่าเยิ้มฉ่ำน้ำมีสีน้ำตาลเป็นทางตามเนื้อไม้และบางครั้งเป็นลายริ้วภายในลำต้น ถ้าไม่ได้รับการรักษาหรือเป็นโรคติดต่อกันนานเชื้อจะลุกลามลงสู่รากและเข้าทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหารทำให้ต้นส้มโอยืนต้นแห้งตาย ส่วนในจังหวัดชัยนาทพบอาการเกิดขึ้นที่รากใต้ดินโดยเมื่อขุดดินลงไปจะพบรากฝอยแห้งเปลือกรากร่อนหลุดง่าย จากการแยกหาเชื้อสาเหตุจากอาการที่พบทั้งสองแหล่งปลูกพบว่า เชื้อสาเหตุของโรคสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA โคโลนีเจริญเต็มจานอาหารใช้เวลา 7 วัน ลักษณะเส้นใยบางมีสีขาว และจากการตรวจเชื้อสาเหตุที่แยกได้และดินบริเวณที่เป็นโรคพบ sporangium zoospores และchlamydospores

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอและศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุที่แยกได้

2.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา เชื้อสาเหตุสร้างเส้นใยสีขาวบางๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อPDA เส้นใยไม่มีผนังกั้น sporangium มีลักษณะกลมรูปไข่ขนาด 20.24-30.36 x 25.3-40.48 µ (25.63 X 33.57 µ)

โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของsporangium เป็น 1.30 ภายใน sporangium มี zoospores จำนวนมากและจะถูกปล่อยออกมาทางปากเปิดด้านบน(papilla) zoospores จะว่ายน้ำเพื่อหาพืชอาศัยและเจริญเติบโตสร้างเส้นใยเข้าทำลายพืชต่อไป chlamydospores รูปร่างกลมผนังหนา มีขนาด 30.36 - 40.48 μ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอพบว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica*

2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในการทำให้เกิดโรค เชื้อที่แยกได้ทำให้ใบส้มโอที่ทำแผลเป็นโรคโดยแสดงอาการเนื้อเยื่อช้ำฉ่ำน้ำภายใน 4 วัน ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ(control)ใบยังคงปกติไม่เป็นโรค

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีวงใสขึ้นล้อมรอบเชื้อที่ขึ้นปะปนบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากพืชชนิดต่างๆ ในแหล่งปลูกต่างกัน ได้แก่แปลงปลูกทานตะวัน จ.นครสวรรค์ที่เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไว้จำนวน 3 ไอโซเลท สวนมะม่วง จ.ฉะเชิงเทราได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 4 ไอโซเลท สวนส้มโออำเภอบางคณฑี จังหวัดสมุทรสงคราม ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 25 ไอโซเลท สวนส้มโอจังหวัดชัยนาท ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 10 ไอโซเลท แปลงปลูกทุเรียน จ.จันทบุรี ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 30 ไอโซเลท และรวมทั้งหมด 72 ไอโซเลท

4. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา*P. parasitica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อPDA (antagonistic reaction) การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จำนวน 72 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อรา *P. parasitica* ทำให้เกิดวงใสจำนวน 54 ไอโซเลทโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ให้ส่วนใสกว้างได้แก่ ไอโซเลท 5102 จากแปลงปลูกทานตะวัน จังหวัดนครสวรรค์ ให้ส่วนใสกว้างขนาด 10.00 มม. ไอโซเลท 5807-1 ซึ่งแยกได้จากแปลงปลูกส้มโอในจังหวัดสมุทรสงคราม ให้ส่วนใสกว้างขนาด 10.00 มม. ไอโซเลท 5907 และ 5908 ซึ่งแยกได้จากแปลงปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี ให้ส่วนใสกว้างขนาด 10.10 มม.และ 10.20 มม.ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

5. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. parasitica* ด้วยวิธี Baiting technique โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. parasitica* ซึ่งได้คัดเลือกจากการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 39 ไอโซเลทมาทดสอบปฏิกิริยาในการลดปริมาณ sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ในดินบ่มเชื้อ โดยการตรวจหาปริมาณ sporangium ทุกครั้งหลังจากใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จากการทดลองพบว่า sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ยังมีชีวิตอยู่ในดินที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทหลังจากใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 1 และหลังจากใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่2 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5808-1 สามารถกำจัดsporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ที่อาศัยอยู่ในดินได้จนหมด และหลังจากใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์

ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102, 5807-1, 5808-1, 5809-1, 5907 และ 5908 สามารถกำจัดเชื้อรา *P. parasitica* ที่มีชีวิตอยู่ในดินได้หมด โดยตรวจไม่พบ sporangium ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ ยังคงตรวจพบ sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* และกรรมวิธีเปรียบเทียบตรวจพบ sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* 95% (ตารางที่ 2)

6. ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการก่อให้เกิดโรคกับใบส้มโอ การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 6 ไอโซเลทต่อการทำให้เกิดโรคบนใบส้มโอพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5807-1, 5907 และ 5908 ทำให้เกิดโรคกับใบส้มโอโดยแสดงอาการวงสีเหลืองรอบบริเวณแผลปลูกเชื้อ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5102, 5808-1 และ 5809-1 ไม่ทำให้เกิดโรคกับใบส้มโอโดยรอบบริเวณแผลที่ปลูกเชื้อยังคงมีสีเขียวปกติเช่นเดียวกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ(control) รอบบริเวณแผลใบยังคงมีสีเขียวปกติ

7. การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีทั้ง 3 ไอโซเลทไปตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดพบว่า ไอโซเลท 5102 เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain WD20 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 58081- และ 5809-1 เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันคือ *Bacillus subtilis* strain CMG M8

8. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. parasitica* จากการทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากเชื้อ *B, subtilis* WD20 ซึ่งเลี้ยงในอาหารPDBเป็นเวลา 2, 4 และ10 วัน พบว่าเชื้อ *P. parasitica* ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารPDA ที่ผสมด้วยสารสกัดจากเชื้อ *B, subtilis* WD20 โดยให้ขนาดโคโลนีเท่ากับที่วางเชื้อทดสอบ 0.60 ซม. ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบยับยั้งการเจริญเติบโต(Fungistasis) และเมื่อนำเชื้อรา *P. parasitica* ที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ปรากฏว่าเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปบนอาหารPDA แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *P. parasitica* ถูกฆ่าทำลาย(Fungicidal) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B, subtilis* WD20 ที่เลี้ยงในอาหารPDBสามารถสร้างสารที่ยับยั้งและฆ่าทำลายเชื้อรา*P. parasitica* และสารนี้สามารถปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในอาหารที่เชื้ออาศัย (substrate) ส่วนสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยง *B, subtilis* WD20ในอาหารPSB สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหารPDAที่ผสมสารสกัดจากเชื้อ *B, subtilis* WD20 แต่ *P. parasitica* ไม่ถูกฆ่าทำลายโดยเชื้อรา *P. parasitica* สามารถเจริญเติบโตให้โคโลนีเล็กๆขนาด 0.80 ซม. ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *B. subtilis* CMG M8 ให้ปฏิกิริยาในการยับยั้งได้น้อย โดยเชื้อ *P. parasitica* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อ *B. subtilis* CMG M8ให้ขนาดโคโลนี 4.20-5.12 ซม. และกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) เชื้อรา*P. parasitica* สามารถเจริญเติบโตให้ขนาดโคโลนี 7-8 ซม.

9. การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอในแปลงปลูก อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม ผลการทดลองพบว่าการรักษาตามกรรมวิธีที่1

โดยทาแผลและราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 หลังจากทาแผลด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ 1 ครั้ง แผลที่เป็นโรคแห้งไม่มีอาการเน่า ไม่มีอาการยางไหล และหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ไป 2 ครั้ง เนื้อเยื่อใหม่มีสีเขียวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วบริเวณแผล หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ไป 3 ครั้ง เปลือกต้นเกิดขึ้นใหม่รอบแผล แผลแห้ง ไม่มีอาการยางไหล และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าบริเวณโคนต้นส้มโอไม่แสดงอาการโรคอีกเลย แผลที่ถูกลอกเปลือกออกสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาหุ้มรอบแผลกลมกลืนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกันกับเนื้อเยื่อเดิม การรักษาตามกรรมวิธีที่2 โดยทาแผลด้วยผงเชื้อและราดดินด้วยน้ำหมักผงเชื้อกับกากน้ำตาลสูตรที่1 พบว่าแผลที่เป็นโรคมียางไหลสีน้ำตาลอ่อนซึ่งต้องทาแผลด้วยผลิตภัณฑ์ซ้ำ 2-3 ครั้ง ทำให้แผลแห้ง ไม่มีอาการยางไหล และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าบริเวณโคนต้นส้มโอไม่แสดงอาการโรคอีกเลย แผลที่ถูกลอกเปลือกออกสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาหุ้มรอบแผลกลมกลืนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกันกับเนื้อเยื่อเดิม การรักษาตามกรรมวิธีที่3 โดยทาด้วยผลิตภัณฑ์ผงเชื้อและราดดินด้วยผงเชื้อในน้ำหมักEMสูตรที่2 พบว่าแผลมีอาการฉ่ำน้ำ และมียางไหลสีน้ำตาลอ่อนต้องทาแผลด้วยผลิตภัณฑ์ซ้ำ 2-3 ครั้งเพื่อให้แผลแห้ง หลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าบริเวณโคนต้นส้มโอบางต้นมีแผลเน่าลุกลามใต้เปลือกขึ้นเป็นทางยาวตามลำต้น ส่วนกรรมวิธีที่ 4 control พบว่าบริเวณแผลฉ่ำน้ำขยายตัวใหญ่ใต้ผงแป้ง อาการยางไหลมีสีน้ำตาลเข้มยังคงรุนแรงต้นส้มโอใบสลดจึงรีบดำเนินการใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* WD 20เพื่อช่วยให้ต้นฟื้นก่อนที่โรคจะลุกลามต่อไป จากการตรวจตัวอย่างดินจากบริเวณรอบต้นที่เป็นโรคในทุกกรรมวิธี พบว่า ก่อนทำการทดลองตัวอย่างดินจากทุกกรรมวิธีมีจำนวน sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ที่อาศัยอยู่ในดินมากมายจนไม่สามารถนับได้ และหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20 ในทุกกรรมวิธีปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดินลดลง กรรมวิธีที่1 หลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อครั้งที่1 ครั้งที่2 และครั้งที่3 พบว่าความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุในดินมีจำนวน 35.65%, 27.35% และ45.15% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำนวน sporangium ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในดินลดลง 64.35% , 72.65% และ 54.85%ตามลำดับ (เฉลี่ย 63.95%) และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าความมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรคในดินมีจำนวน 33.38% แสดงว่าปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินลดลง 66.62% กรรมวิธีที่2 หลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อครั้งที่1 ครั้งที่2 และครั้งที่3 พบว่าความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุในดินมีจำนวน 39.83%, 27.42% และ 40.42%ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำนวน sporangium ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในดินลดลง 60.17%, 72.58% และ 59.58%ตามลำดับ (เฉลี่ย 64.11%) และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าความมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรคในดินมีจำนวน 33.83% แสดงว่าปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินลดลง 66.17% กรรมวิธีที่3 หลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อครั้งที่1 ครั้งที่2 และครั้งที่3 พบว่าความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุในดินมีจำนวน 53.17%, 43.83% และ51.75% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำนวน sporangium ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในดินลดลง 46.83%, 56.17%

และ 48.25%ตามลำดับ(เฉลี่ย 54.67%) และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าความมีชีวิตของเชื้อราสาเหตุโรคในดินมีจำนวน 44.28% แสดงว่าปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบในดินลดลง 55.72% (ตารางที่ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจโรคในแหล่งปลูกส้มโอจังหวัดสมุทรสงครามพบโรครากเน่าและโคนเน่าระบาดรุนแรง ต้นส้มโอที่ปลูกในจังหวัดสมุทรสงครามจะแสดงอาการโรคให้เห็นได้อย่างเด่นชัดบริเวณโคนต้นเหนือดินมีรอยช้ำฉ่ำน้ำ และมีน้ำยางสีน้ำตาลเข้มไหล เมื่อลอกผิวเปลือกจะพบแผลเน่าเยิ้มฉ่ำน้ำมีสีน้ำตาลเป็นทางตามเนื้อไม้และบางครั้งเป็นลายริ้วภายในลำต้น ถ้าไม่ได้รับการรักษาหรือเป็นโรคติดต่อกันนานเชื้อจะลุกลามลงสู่รากและเข้าทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหารทำให้ต้นส้มโอยืนต้นแห้งตาย ส่วนในจังหวัดชัยนาทพบอาการเกิดขึ้นที่รากใต้ดินโดยเมื่อขุดดินลงไปจะพบรากฝอยแห้งเปลือกรากร่อนหลุดง่าย จากการแยกหาเชื้อสาเหตุจากอาการที่พบทั้งสองแหล่งปลูกพบเชื้อรา *Phytophthora parasitica* เป็นสาเหตุโรครากเนาและโคนเน่าของส้มโอโดยพบเส้นใยไม่มีผนังกั้น sporangium มีลักษณะกลมรูปไข่ขนาด 20.24-30.36 x 25.3-40.48 µ (25.63 X 33.57 µ) โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของsporangium เป็น 1.30 ภายใน sporangium มี zoospores จำนวนมากและจะถูกปล่อยออกมาทางปากเปิดด้านบน(papilla) chlamydospores รูปร่างกลมผนังหนามีขนาด 30.36 - 40.48 µ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้รวมทั้งหมด 72 ไอโซเลท และจากการนำมาคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามขั้นตอนและวิธีการต่าง ๆทำให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถกำจัด sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ในดินได้ดีและไม่ทำให้เกิดโรคกับส้มโอจำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท 5102, 5808-1 และ 5809-1จากการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่า ไอโซเลท 5102 เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* strain WD20 ส่วนไอโซเลท 58081- และ 5809-1 เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันคือ *Bacillus subtilis* strain CMG M8 เชื้อ *B. subtilis* strain WD20สามารถสร้างสารที่ให้ปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโต (Fungistasis) และฆ่าทำลายเชื้อ(Fungicidal) เชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *B. subtilis* strain WD20 สามารถรักษาและป้องกันกำจัดโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอโดยทำให้ต้นที่เป็นโรคหายจากโรครากเน่าและโคนเน่าโดยมีเปลือกต้นเกิดขึ้นใหม่รอบแผลอย่างรวดเร็ว แผลแห้ง ไม่มีอาการยางไหล และหลังจากนั้น 3 เดือนพบว่าบริเวณโคนต้นส้มโอไม่แสดงอาการโรคอีกเลย แผลที่ถูกลอกเปลือกออกสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาหุ้มรอบแผลกลมกลืนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกันกับเนื้อเยื่อเดิมและปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบจากดินในแปลงปลูกลดลง 66.62%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณบุญเลิศ พันธุ์โภคา ที่ให้การสนับสนุนในการจัดหาแปลงที่เป็นโรครากเน่าและโคนเน่าใน อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B. subtilis* WD 20

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ด้วงทองและ สุนิสา อธิวงศ์ธนวัฒน์. 2537. การปลูกส้มโอ.สำนักฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/tree_fruit/fruit27.pdf (23/03/52)

นิรนาม. 2550. การส่งออกสินค้าเกษตรไทย ตอนที่2. หน้า18. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศปี2550. ศูนย์สาระสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

รวี เสรฐภักดี.2523.ไม้ผลทางอุตสาหกรรม ll (ส้ม).เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาพืชสวน 542.ภาควิชาพืชสวน.คณะเกษตร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.108 หน้า

Campbell,R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge university press. New York Port Chester Melbourne Sydney. 218 p.

Erwin,D.C. and Ribeiro,O.K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide.The American Phytopathological Society. St. Paul,Minnesota, USA. 562 p.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลทต่างๆ ต่อเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอ

ไอโซเลท	แหล่งปลูก/พืช	ปฏิกิริยาการยับยั้ง (%)	บริเวณวงใส (มม.)
Control	-	0	0
5100	จ.นครสวรรค์/ทานตะวัน	68.72	7.08
5101	จ.นครสวรรค์/ทานตะวัน	67.88	6.90
5102	จ.นครสวรรค์/ทานตะวัน	65.82	10.00
5603	จ.ฉะเชิงเทรา/มะม่วง	54.19	7.00
5604	จ.ฉะเชิงเทรา/มะม่วง	58.91	8.37
5608	จ.ฉะเชิงเทรา/มะม่วง	64.61	7.20
5610	จ.ฉะเชิงเทรา/มะม่วง	64.00	7.17
5802	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	54.10	5.80
5803	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	57.90	9.90
5804	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	66.74	8.10
5805	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	64.60	9.70
5806	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	67.09	9.10
5807-1	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	67.32	10.00
5807-2	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	63.82	9.60
5808-1	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	68.26	8.20
5808-2	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	66.39	7.60
5808-3	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	67.67	7.60
5809-1	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	67.32	8.10
5809-3	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	67.32	8.20
5814	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	6.42	0
5815	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	3.70	0
5816	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	0.19	0
5817	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	1.17	0
5818	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	5.45	0

ไอโซเลท	แหล่งปลูก/พืช	ปฏิกิริยาการยับยั้ง (%)	บริเวณวงใส (มม.)
5819	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	8.75	0
5820	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	17.90	0
5821	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	2.12	0
5822	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	56.23	0.80
5823	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	43.68	0
5824	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	63.81	6.70
5825	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	64.20	6.30
5826	จ.สมุทรสงคราม/ส้มโอ	61.67	6.00
5827	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	59.29	9.80
5828	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	58.82	7.80
5829	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	59.76	8.80
5830	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	54.82	8.10
5831	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	55.29	7.00
5833	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	55.29	8.30
5834	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	57.65	9.30
5835	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	58.56	7.10
5836	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	54.82	8.50
5837	จ.ชัยนาท/ส้มโอ	59.29	9.20
5901	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	28.99	0
5902	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	7.39	0
5903	จ,จันทบุรี/ทุเรียน	67.51	7.20
5904	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	66.54	7.90
5905	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	4.47	0
5906	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	70.43	8.50
5907	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	67.77	10.10
5908	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	64.20	10.20
5909	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	5.64	0
5910	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	59.53	5.80
5911	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	13.62	0

ไอโซเลท	แหล่งปลูก/พืช	ปฏิกิริยาการยับยั้ง (%)	บริเวณวงใส (มม.)
5912	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	62.06	8.20
5913	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	65.76	7.60
5914	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	62.06	9.80
5919	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	59.92	9.40
5920	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	57.39	7.80
5921	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	42.02	0
5922	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	61.28	6.50
5923	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	54.86	7.80
5926	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	63.81	6.10
5927	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	63.62	6.60
5928	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	43.00	1.30
5930	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	65.37	0
5931	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	58.80	10.30
5932	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	57.20	8.80
5933	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	39.30	0
5934	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	57.20	8.90
5935	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	47.28	2.20
5936	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	22.37	0
5937	จ.จันทบุรี/ทุเรียน	59.53	9.50

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ ในการลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในดินบ่มเชื้อ(infested soil) โดยตรวจด้วยวิธี baiting technique

ไอโซเลท	ความมีชีวิตอยู่รอดในดินของเชื้อรา *P. parasitica* (%)					
	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 1	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 2	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 3
5100	16	78.75 l[1/]	12	51.25 g[1/]	9	16.25 cd[1/]
5102	5	56.25 d	2	8.75 b	1	0.00 a
5603	16	78.75 l	12	51.25 g	7	13.75 bcd
5604	16	78.75 l	11	43.75 f	2	8.75 b
5608	12	72.45 hij	9	40.00 def	3	10.00 bc
5610	18	83.75 mn	19	66.25 ij	8	15.00 bcd
5803	13	73.75 ijk	14	55.00 gh	4	10.00 bc
5804	9	65.00 fg	8	38.75 def	7	13.75 bcd
5805	5	56.25 d	5	33.75 d	2	8.75 b
5806	8	61.25 ef	7	36.25 de	5	11.25 bc
5807 - 1	3	40.00 bc	4	16.25 c	1	0.00 a
5808 – 1	1	18.75 a	1	0.00 a	1	0.00 a
5809 – 1	2	38.75 b	3	11.25 bc	1	0.00 a
5824	11	71.25 hi	9	40.00 def	12	26.25 fg
5825	20	86.25 no	12	51.25 g	19	40.00 jg

ไอโซเลท	ความมีชีวิตอยู่รอดในดินของเชื้อรา *P. parasitica* (%)					
	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 1	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 2	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 3
5826	7	60.00 de	8	38.75 def	7	13.75 bcd
5828	20	86.00 no	13	53.75 gh	16	35.00 hij
5834	5	56.25 d	7	36.25 de	4	10.00 bc
5835	15	77.50 kl	6	35.00 de	11	23.75 ef
5837	16	78.75 l	16	60.00 hi	13	28.75 fg
5903	6	58.75 de	9	40.00 def	6	12.50 bc
5904	13	73.75 ijk	12	51.25 g	16	35.00 hij
5906	17	80.00 lm	13	53.75 gh	21	46.25 lm
5907	4	43.75 c	4	16.25 c	1	0.00 a
5908	2	38.75 b	3	11.25 bc	1	0.00 a
5910	23	92.50 p	21	77.50 k	24	58.75 o
5912	10	68.75 gh	12	51.25 g	10	18.75 de
5913	16	78.75 l	15	56.25 gh	17	36.25 ij
5914	13	73.75 ijk	9	40.00 def	14	30.00 gh
5919	19	85.00 n	15	56.25 gh	19	40.00 jk
5920	22	91.25 p	20	70.00 j	23	52.50 n
5922	18	83.75 mn	18	65.00 ij	20	42.50 kl
5923	6	58.75	9	40.00	7	13.75 bcd

ไอโซเลท	ความมีชีวิตอยู่รอดในดินของเชื้อรา *P. parasitica* (%)					
	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 1	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 2	ลำดับที่	ใส่เชื้อครั้งที่ 3
5926	13	73.75 de ijk	12	51.25 g def	12	26.25 fg
5927	10	68.75 gh	11	43.75 f	10	18.75 de
5931	18	83.75 mn	20	70.00 j	22	48.75 mn
5932	21	90.00 op	17	63.75 ij	18	38.75 jk
5934	14	76.25 jkl	10	41.25 ef	9	16.25 cd
5937	17	80.00 lm	12	51.25 g	15	31.25 ghi
control	24	100.00 q	22	96.25 l	25	95.00 p
Means		70.47		45.34		23.66
CV.		3.1%**		6.6%**		11.6%**

[1/]อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีDMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

<u>ตารางที่3</u> ความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อรา *P. parasitica* ในดินก่อนและหลังการใส่ผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *B. subtilis* WD20 ในแปลงปลูกส้มโออำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยปริมาณ sporangium ที่ตรวจพบ (%)				
	ก่อนการใส่ผลิตภัณฑ์	หลังการใส่ผลิตภัณฑ์			
		ใส่เชื้อครั้งที่ 1	ใส่เชื้อครั้งที่ 2	ใส่เชื้อครั้งที่ 3	3 เดือน
ผลิตภัณฑ์ผงเชื้อ	100	35.65	27.35	45.15	33.38
น้ำหมักผงเชื้อกับกากน้ำตาล	100	39.83	27.42	40.42	33.83
ผงเชื้อกับน้ำหมักชีวภาพ(EM)	100	53.17	43.83	51.75	44.28

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ด้วงทองและ สุนิสา อธิวงศ์ธนวัฒน์. 2537. การปลูกส้มโอ. สำนักและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/tree_fruit/fruit27.pdf (23/03/52)

นิรนาม. 2552. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2552. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 129 หน้า.

รวี เสรฐภักดี. 2523. ไม้ผลทางอุตสาหกรรม(ส้ม) เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.108 หน้า

สมคิด ดิสถาพร.2540. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร. 92 หน้า

James,C. 1971 . A Manual of Assessment Keys for Plant Diseases. The Amarican Phytopathological Society . St. Paul MN 55121 USA. 28 pp.

Pal, K.K. and B.McSpadden Gardener.2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Uematsu, T.,Chuenchitt, S.Karnjanarat, S., Vivithajinda, S.,Nabheerong, S.,Benjathikul, S.,Nilmanee, S.,Dhirabhava, W. andBuanghuwon, D.1983.Bacterial Diseases on Economic Crops in Thailand, Topoical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.