โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้โดยใช้ lipopeptide จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*

ชื่อนิสิต นายณัฐพงษ์ บุตรรักษ์ รหัสประจำตัว 6032021123

ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้โดยใช้ lipopeptide จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*

Inhibition of orchid-pathogenic fungi by lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens*

ชื่อนิสิต นายณัฐพงษ์ บุตรรักษ์ **เลขประจำตัว** 6032021123

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้โดยใช้ lipopeptide จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*

Inhibition of orchid-pathogenic fungi by lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens*

นายณัฐพงษ์ บุตรรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้โดยใช้ lipopeptide จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นายณัฐพงษ์ บุตรรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ปัญหาจากศัตรูพืชในกล้วยไม้ โดยเฉพาะจากเชื้อราโรคพืชเข้าทำลายกล้วยไม้ เป็นหนึ่งในปัญหาที่มีความสำคัญในการปลูกกล้วยไม้เพื่อจำหน่ายและส่งออกของประเทศไทย จากการศึกษาแบคทีเรียในสกุล Bacillus พบว่าสามารถสร้างสาร lipopeptide ที่ใช้ควบคุมศัตรูพืชได้ และยังสามารถกระตุ้นกลไกการตอบโต้และการป้องกันตัวเองในพืช ซึ่งจัดว่าเป็นการควบคุมทางวิธีชีวภาพ (biological control) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถสร้าง lipopeptide ได้ แต่ยังไม่มีการนำมาทดลองเรื่องประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคบนกล้วยไม้ ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือเพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพของสารคัดหลั่งที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแต่ละเชื้อราใน 5 ชนิดที่ก่อโรคในกล้วยไม้ ได้แก่ *Colletotrichum sp., Phyllosticta sp., Cladosporium sp., Sclerotium sp.* และ *Fusarium sacchari* เริ่มต้นจากการผลิตสารคัดหลั่งจากแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 ต่อเชื้อราก่อโรคในพืชทั้ง 5 ชนิดในห้องทดลอง โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสม lipopeptide สำหรับปริมาณการผลิตสารคัดหลั่งจากแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 พิจารณาจากผลการทดสอบ drop collapse test ได้เลือก Pterious Broth ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ผลิตสาร lipopeptide ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ พบว่า lipopeptide สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดแต่สามารถยับยั้ง *Sclerotium.* sp. ได้มีประสิทธิภาพที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.17±2.43% ในวันที่ 7 รองลงมาเป็น *Phyllosticta sp.* เท่ากับ 70.56% ในวันที่ 7 ในขณะที่ *F. sacchari, Cladosporium sp. และ Collectotrichum sp.* สามารถถูกยับยั้งได้บางส่วนมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 42.59±2.60% ในวันที่ 3, 55.14% ในวันที่ 7 และ 35.52±3.80% ในวันที่ 3 ตามลำดับ lipopeptide ทั้งนี้การยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด จาก lipopeptide ที่ผ่านการ autoclave พบว่า ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราลดลง เนื่องจาก lipopeptide จะเกิดการเสื่อมสภาพเมื่อผ่านอุณหภูมิสูง ดังนั้นอาจถูกนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในอุตสาหกรรมกล้วยไม้ได้

คำสำคัญ: ศัตรูพืช, biological control, drop collapse test, Pterious Broth

Research Title	: Inhibition of orchid-pathogenic fungi by lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens*
Student name	: Mr. Nattapong Butruk
Advisor	: Krieng Kanchanawatee, Ph.D.
Department of	: Biology

Abstract

The problem of pest infestation in orchids, especially orchid-pathogenic fungi, is one of the most important problems in growing orchids for sale and export in Thailand. Studies of bacteria in the genus *Bacillus* have found that they can secrete lipopeptides used as pest biocontrol agents and stimulate the mechanism of retaliation against plant pathogens and self-defense in plants, classified as biological control. In addition, *Bacillus amyloliquefaciens* was found to produce lipopeptide, but no experiments were conducted on the effectiveness of inhibiting pathogenic fungi in orchids. Therefore, the purpose of this research is to study and compare the differences in secretion efficacy produced from the C59 strain of *B. amyloliquefaciens* to the growth of five pathogenic fungi species: *Colletotrichum sp., Phyllosticta sp., Cladosporium sp., Sclerotium sp.* and *Fusarium sacchari*. The study started with the production of secretions from the C59 strain, then will be tested the effectiveness of the C59 species against five pathogenic fungi in the laboratory and on orchid plants. The production of C59 secretions measured by the drop collapse test, so Pterious broth was selected as a bacterial culture medium to produce lipopeptides. From the present studies, lipopeptides can inhibit five species of fungi. Lipopeptide was the most effective against *Sclerotium sp.* (87.17±2.43%; day 7), followed by *Phyllosticta sp.* (70.56%; day 7) *F. sacchari, Cladosporium sp. and Collectotrichum sp.* were partially inhibited by lipopeptide (42.59±2.60%; day 3, 55.14%; day 3 and 35.52±3.80%; day 7 respectively). The inhibition of five pathogenic fungi by the autoclaved lipopeptide was found to be less effective in inhibiting fungi because the lipopeptide deteriorates when exposed to high temperatures. Presumably, lipopeptides are likely to be used as biocontrol agents in the orchid industry.

Keywords: biological control, drop collapse test, pests, Pterious Broth

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตีอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาระหว่างการปฏิบัติการท่ามกลางปัญหาของการระบาดของเชื้อไวรัสโควิด 19 ตลอดจนการวิเคราะห์ข้อมูลและตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นิสิตภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา, อาจารย์ ดร.มารุต เฟื่องอาวรณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมถึงวัสดุและอุปกรณ์ ในการปฏิบัติการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยาและคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก
ABSTRACT ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 3
2.1. โรคและศัตรูในกล้วยไม้ 3
2.2. เชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 3
2.2.1. *Colletotrichum* sp. 3
2.2.2. *Phyllosticta sp.* 5
2.2.3. *Cladosporium sp.* 6
2.2.4. *Sclerotium sp.* 6
2.2.5. *Fusarium sacchari* 7
2.3.1. ประเภทของการควบคุมโดยชีววิธี 8
2.4. *Bacillus sp.* 8
2.4.1. *Bacillus amyloliquefaciens* 9
2.5. lipopeptide 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 11
3.1. การเตรียม lipopeptide จาก *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59 11
3.1.1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria Bertani (LB) 11
3.1.2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Pretorios broth (PB) 11
3.1.3. การผลิตสาร lipopeptide 11
3.2. วัดปริมาณการผลิตสาร lipopeptide ด้วย drop collapse test 13
3.2.1. การทำกราฟมาตรฐานของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร lipopeptide 13

3.2.2. วัดความสามารถในการกระตุ้นการผลิตสาร lipopeptide ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Pretorios broth (PB) โดย drop collapse test 13
3.3. การเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเชื้อราก่อโรค 5 ชนิด 13
3.4. การทดสอบประสิทธิภาพของสาร lipopeptide ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด. 14
3.4.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide 14
3.4.2. การทดสอบยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide 16
3.4.3. การทดสอบเชิงสถิติของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อราแต่ละชนิด 17
บทที่ 4 ผลการศึกษา 18
4.1. กราฟมาตรฐานของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร lipopeptide 18
4.2. การทดสอบยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด 19
4.2.1. การทดสอบวันที่ 1 19
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง 19
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave 20
4.2.2. การทดสอบวันที่ 3 22
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง 22
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave 23
4.2.3. การทดสอบวันที่ 7 24
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง 24
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave 26
4.2.4. การทดสอบวันที่ 14 27
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง 27
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave 28
4.3. การทดสอบเชิงสถิติของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด เทียบกับในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide 29
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 32
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 34
6.1. สรุปผลการศึกษา 34

6.2. ข้อเสนอแนะ 34
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการเตรียมเพลท lipopeptide ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา 34
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 35
เอกสารอ้างอิง 36
ภาษาไทย 36
ภาษาอังกฤษ 37
ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างขนาดหยดและความเข้มข้นของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) 41
ภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลการแสดงผลการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ในเชื้อรา 5 ชนิด ทดสอบโดยวิธี Shapiro-Wilk test 42
ภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลการแสดงความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Fusarium sacchari* ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test 43
ภาคผนวกที่ 4 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Sclerotium* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test 43
ภาคผนวกที่ 5 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Collectotrichum* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test 44
ภาคผนวกที่ 6 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Phyllosticta* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test 44
ภาคผนวกที่ 7 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Cladosporium* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test .. 45
ภาคผนวกที่ 8 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 1 วัน 45
ภาคผนวกที่ 9 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 3 วัน 50
ภาคผนวกที่ 10 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 7 วัน 54
ภาคผนวกที่ 11 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง *phyllosticta* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมlipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 14 วัน 59
ภาคผนวกที่ 12 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 1 วัน 60

ภาคผนวกที่ 13 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 3 วัน 65
ภาคผนวกที่ 14 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 7 วัน 70
ภาคผนวกที่ 15 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *phyllosticta* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมlipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 14 วัน 77
ภาคผนวกที่ 16 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 1 วัน 78
ภาคผนวกที่ 17 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 3 วัน 83
ภาคผนวกที่ 18 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 7 วัน 87
ภาคผนวกที่ 19 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *phyllosticta* sp. และ *cladosporium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 14 วัน 91

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3-1 อัตราส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา..... 15
ตารางที่ 4-1 การทดสอบการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด..... 30
ตารางที่ 4-2 Kruskal Wallis test เปรียบเทียบระหว่างเชื้อราแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของ lipopeptide ในแต่ละช่วงเวลา..... 30

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 อนุกรมวิธานของ *Colletotrichum Sp.* 3
ภาพที่ 2-2 โรคแอนแทรคโนสกล้วยไม้ 4
ภาพที่ 2-3 อนุกรมวิธานของ *Phyllosticta Sp.* 5
ภาพที่ 2-4 โรคใบขี้กลาก 5
ภาพที่ 2-5 อนุกรมวิธานของ *Cladosporium Sp.* 6
ภาพที่ 2-6 อนุกรมวิธานของ *Sclerotium Sp.* 6
ภาพที่ 2-7 อนุกรมวิธานของ *Fusarium Sacchari* 7
ภาพที่ 2-8 อนุกรมวิธานของ *Bacillus Amyloliquefaciens* 9
ภาพที่ 2-9 โครงสร้าง Surfactins, Fengycins และ Iturins..... 10
ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานระหว่างขนาดหยดและความเข้มข้นของ Sodium Dodecyl Sulfate (Sds) กราฟมาตรฐานแบบ Scatter Plot ระหว่างขนาดหยดในหน่วยพิเซล และ Sds ความเข้มข้นเป็น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 และ 0% (W/V) โดยมีสมการเส้นตรง Y = 40367x + 1305808 และมีค่า R-Square = 0.786 การทดลอง 3 ซ้ำ 18
ภาพที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptiide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แสดงข้อมูล Standard Error (S.E.)..... 20
ภาพที่ 4-3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptiide ที่ Autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ..... 21
ภาพที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แสดงข้อมูล Standard Error (S.E.)..... 23
ภาพที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptide ที่ Autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ..... 24

ภาพที่ 4-6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วันทำการทดลอง 2 ซ้ำ แสดงข้อมูล Standard Error (S.E.)..... 25
ภาพที่ 4-7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย Lipopeptde ที่ Autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ..... 27
ภาพที่ 4-8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta* ของ Lipopeptide เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แสดงข้อมูล Standard Error (S.E.) 28
ภาพที่ 4-9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta* และ *Cladosporium* ทดสอบด้วย Lipopeptide ที่ Autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ..... 29

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนอันดับ 1 ของโลก มีประเทศไต้หวัน สิงค์โปร์ มาเลเซีย นิวซีแลนด์ เป็นประเทศคู่แข่ง ไทยมีส่วนแบ่งการค้าในตลาดโลก ในปี พ.ศ. 2562 มีมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดและต้นกล้วยไม้ประมาณ 2.6 พันล้านบาท โดยมีผู้ประกอบการส่งออกกล้วยไม้ประมาณ 115 ราย ดอกกล้วยไม้ถูกแบ่งประเภทตามตามลักษณะการส่งออก ได้แก่ ก้าน/ช่อ (Stem) ดอก (Bloom) พวงมาลัย (Pieces) ดอกไม้ติดเสื้อ (Corsage) และ จัดช่อ (Pieces) โดยส่งออกประเภทก้าน/ช่อมากที่สุด ซึ่งชนิดที่ส่งออกมาก ได้แก่ สกุลหวาย มอคคารา และ ออนซิเดียม เป็นต้น นอกจากนี้มีการส่ง ออกต้นกล้วยไม้ (Plants) และไม้ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Flasks) ได้แก่ สกุลหวาย ฟาแลนนอปซิส แวนดา ออนซิเดียม คัทลียา และมอคคารา (ศรีสุดา โท้ทอง, 2558)

ปัญหาจากศัตรูพืช โดยเฉพาะจากเชื้อราโรคพืชเข้าทำลายกล้วยไม้ โดยเฉพาะกล้วยไม้จำหน่ายต้นและตัดดอกส่งจำหน่าย เป็นปัญหาหนึ่งที่เริ่มเข้ามามีความสำคัญในการปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทย ทำให้กล้วยไม้ขาดคุณภาพตามที่ตลาดต้องการ เนื่องจากสภาพการผลิตกล้วยไม้ต้องอาศัยโรงเรือนที่มีความชื้นประกอบกับอุณหภูมิส่วนใหญ่ของพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ในภาคกลางค่อนข้างสูงตลอดทั้งปี ทำให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืช ยิ่งในกรณีที่ผู้ประกอบการไม่เอาใจใส่ในการดูแลเรื่องโรค ก็จะทำให้โรคของกล้วยไม้ระบาดไปทำความเสียหายมากขึ้น (อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ, 2557)

โรคพืชที่เข้าทำลายกล้วยไม้มีหลายชนิดและมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าศัตรูพืชชนิดอื่นๆ เช่น โรคแอนแทรดโนส เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โรคใบขึ้นเหลืองเป็นโรคที่สำคัญของกล้วยไม้สกุลหวาย เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* โรคใบจุดหรือโรคใบขี้กลาก เกิดจากเชื้อรา *Phyllosticta sp.* โรคนี้ทำให้ใบร่วงเช่นเดียวกับโรคขึ้นเหลือง แต่ความรุนแรงจะน้อยกว่า โรคเน่าดำ, โรคยอดเน่า หรือโรคเน่าเข้าไส้ เกิดจากเชื้อรา *Phytophthoro palmivora* เป็นตัน (ศรีสุดา โท้ทอง, 2554)

จากการได้ศึกษาแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* พบว่าสามารถสร้างสารที่ใช้ควบคุมศัตรูพืชโดยทางวิธีชีวภาพได้ (biological control) นอกเหนือจากนั้น *Bacillus* บางสายพันธุ์ยังกระตุ้นกลไกการตอบโต้การป้องกันตัวเองในพืช การตอบสนองดังกล่าวเป็นการป้องกันช่วยให้พืชสามารถต่อต้านการติดเชื้อได้ และจากตัวอย่างการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความต้านทานที่เกิดจากเชื้อ *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pasteurii, B. cereus, B. pumilus, B. mycoides* และ *B. sphaericus* สายพันธุ์ลดความรุนแรงของโรคต่าง ๆ ในมะเขือเทศ พริกไทย แตงโม บีทรูท ยาสูบ และ แตงกวา

ความต้านทานที่เกิดขึ้นสามารถตอบสนองอย่างเพียงพอต่อ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และ แมลง (Yamamoto et al., 2014) จากงานวิจัยก่อนหน้ามีการนำ *B. subtilis* ที่สร้าง lipopeptide ไปยับยั้งเชื้อราในสกุล *Saccharicola, Cochliobolus, Alternaria* และ *Fusarium* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ โดยใช้ประสิทธิภาพของ lipopeptide เป็นตัวควบคุมเชื้อรา (Hazarika et al., 2019)

ดังนั้น โครงการนี้จึงศึกษาแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ที่สามารถสร้าง lipopeptide ได้เช่นเดียวกันกับ *B. subtilis* แต่ยังไม่ได้มีการนำมาทดลองเรื่องประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่ก่อโรคบนกล้วยไม้ ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยด้านการเกษตรต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพของสารคัดหลั่งที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแต่ละเชื้อราใน 5 ชนิดที่ก่อโรคในกล้วยไม้ ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp., *Cladosporium* sp., *Sclerotium* sp. และ *Fusarium sacchari*

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. โรคและศัตรูในกล้วยไม้

ปัจจัยที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อกล้วยไม้มีมากมายที่ทำให้เกษตรกรผู้ผลิตกล้วยไม้ไม่สามารถขายหรือส่งออกได้ เช่น สภาพอากาศ โรคและแมลงศัตรูพืชที่ระบาด โดยเฉพาะโรคและแมลงศัตรูพืช ตัวอย่างแมลงที่ทำให้เกิดความเสียหาย ได้แก่ พวกเพลี้ยไฟ, เพลี้ยหอย, บั่วกล้วยไม้, หนอนผีเสื้อ และหอยทาก เป็นต้น และตัวอย่างโรคที่เป็นปัญหาสำคัญ มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา และไวรัส อาทิเช่น โรคใบจุด, โรคราดำ, โรคเน่าส่วนต่าง ๆ, โรคราเมล็ดผักกาด, โรคใบและดอกกระ และโรคไวรัส (ศรีสุดา โท้ทอง, 2554)

2.2. เชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้

2.2.1. *Colletotrichum* sp.

Domain Eukaryota
Kingdom Fungi
Division Ascomycota
Class Sordariomycetes
Order Glomerellales
Family Glomerellaceae
Genus *Colletotrichum*

ภาพที่ 2-1 อนุกรมวิธานของ *Colletotrichum sp.* (Corda, 1831)

ราสกุล *Colletotrichum* จัดอยู่ในอันดับ Glomerellales วงศ์ Glomerellaceae ดังภาพที่ 2-1 มีลักษณะทั่วไป คือ เส้นใยไม่มีสี หรือ อาจมีสีน้ำตาล เส้นใยมีผนังกั้น (septate) ส่วนขยายพันธุ์เรียกว่าโคนิเดีย (conidia) มีลักษณะเป็นเซลล์เดียวที่ไม่มีผนังกั้น โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า acervulus อยู่ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก โคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้งหรือเป็นของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู ราจะสร้างโคนิเดียเป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium บนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสังเกตลักษณะของ acervulus จึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ บางครั้งพบการสร้าง sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อโคนิเดียเดี่ยวๆ ไม่มีสี เซลล์เดียวผนังบางเรียบ รูปไข่ หรือ ยาวรี บางชนิดมีการสร้าง sterilehypha สีน้ำตาล ผนังหนาเรียบปลายแหลมคล้ายหนาม เรียกว่า setae เกิดบริเวณขอบของ acervulus หรือ

ปะปนกับก้านชูโคนิเดีย ลักษณะการสร้าง setae ของราชนิดนี้ไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอพเพรสซอเรีย (appressoria) ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมกลมรีหรือรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งมีรอยหยัก (lobe) เดี่ยว ๆ หรือ เกิดติดกันเป็นกลุ่มระยะ teleomorph ของเชื้อรา Colletotrichum จัดอยู่ในสกุล Glomerella (Sutton, 1980 ; วิจัย, 2546)

เชื้อรา *Colletotrichum sp.* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสกล้วยไม้ (Anthracnose) ลักษณะอาการ ใบจะเป็นแผลวงกลมสีน้ำตาลอมแดงหรือสีน้ำตาลไหม้ซึ่งขยายออกเป็นแผลใหญ่เห็นเป็นวงกลมซ้อนกันหลายชั้น เนื้อเยื่อที่เป็นแผลบุ๋มลึกลงไปต่ำกว่าระดับผิวใบเล็กน้อย (ภาพที่ 2-2) (กองส่งเสริมอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย, 2559)

ภาพที่ 2-2 โรคแอนแทรคโนสกล้วยไม้ ลักษณะอาการใบจะเป็นแผลวงกลมสีน้ำตาลอมแดงหรือสีน้ำตาลไหม้ซึ่งขยายออกเป็นแผลใหญ่เห็นเป็นวงกลมซ้อนกันหลายชั้น เนื้อเยื่อที่เป็นแผลบุ๋มลึกลงไปต่ำกว่าระดับผิวใบเล็กน้อย

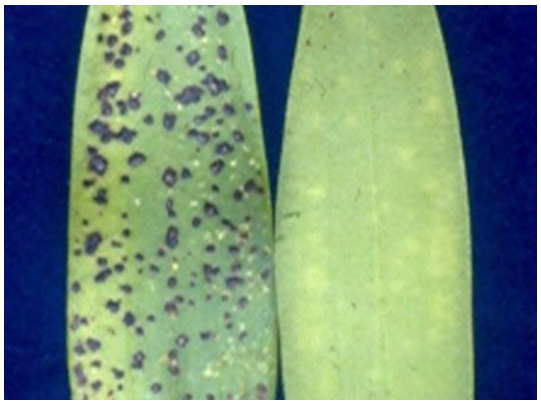
(แหล่งที่มา:https://www.bloggang.com/mainblog.php?id=pumorchids&month=28-08-2008&group=24&gblog=5)

2.2.2. *Phyllosticta sp.*

Domain Eukaryota
Kingdom Fungi
Division Ascomycota
Class Dothideomycetes
Order Botryosphaeriales
Family Botryosphaeriaceae
Genus *Phyllosticta*

ภาพที่ 2-3 อนุกรมวิธานของ *Phyllosticta sp.* (Wikee, et al., 2011)

เชื้อรา *Phyllosticta* sp. จัดอยู่ในอันดับ Botryosphaeriales วงศ์ Botryosphaeriaceae ดังภาพที่ 2-3 เป็นสาเหตุโรคใบจุดหรือโรคใบขี้กลาก ทำให้ใบร่วงและทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงน้อยลง ลักษณะของโรคในระยะแรกมีแผลเป็นจุดหรือแต้มสีเหลือง ต่อมาเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ในกล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะอาการของโรคใบจุดในระยะแรกคล้ายกับโรคใบขึ้นเหลือง แต่รอยแผลกลมสีเหลืองมีขนาดเล็กกว่า และต่อมาเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ขอบแผลมีสีน้ำตาลอ่อน แผลค่อนข้างกลม จึงเรียกโรคนี้ในกล้วยไม้สกุลหวายว่า "โรคใบจุด" ส่วนอาการของโรคนี้ในกล้วยไม้สกุลแวนด้า จะแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลหวาย คือแผลมีลักษณะยาวรี ซึ่งบริเวณตรงกลางแผลสีดำจะมีการสร้างสปอร์ขึ้นมาเป็นตุ่มนูนสีน้ำตาลดำ เรียกโรคนี้ว่าโรคขี้กลาก (ภาพที่ 2-4) (ศรีสุดา โท้ทอง, 2554)



ภาพที่ 2-4 โรคใบขี้กลาก ลักษณะของโรคในระยะแรกมีแผลเป็นจุดหรือแต้มสีเหลืองต่อมาเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ขอบแผลมีสีน้ำตาลอ่อน แผลค่อนข้างกลม (แหล่งที่มา: http://oknation.nationtv.tv/blog/horti-asia/2012/12/19/entry-4)

2.2.3. ***Cladosporium sp.***

Domain Eukaryota
Kingdom Fungi
Division Ascomycota
Subdivision Pezizomycotina
Class Dothideomycetes
Order Capnodiales
Genus *Cladosporium*

ภาพที่ 2-5 อนุกรมวิธานของ *Cladosporium sp.* (Scoch, et al., 2006)

รา *Cladosporium* จัดอยู่ในอันดับ Capnodiales วงศ์ Cladosporium ดังภาพที่ 2-5 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชหลายชนิด เช่น *Cladosporium capsici* ที่ก่อโรคดอกไหม้ (flower blight) ในเบญจมาศ *C. cucumerinum* โรคราดำ (leaf mold) ในแตงโม และรา *Cladosporium* sp. ที่เป็นสาเหตุโรคราดำในกล้วยไม้ มีลักษณะอาการคือเกิดแผลจุดที่ใบ ในระยะเริ่มต้นเป็นจุดสีเหลือง ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สร้างเส้นใย conidiophores ซึ่งมีลักษณะเป็นก้านยาวและมีการแตกกิ่งของก้านชู จึงมี spore ปริมาณมาก และสามารถแพร่กระจายได้ในระยะที่ไกลมาก (ชนินทร ดวงสอาด, พรพิมล อธิปัญญาคม และ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ, 2556)

2.2.4. ***Sclerotium sp.***

Domain Eukaryota
Kingdom Fungi
Division Basidiomycota
Class Basidiomycetes
Subclass Agaricomycetidae
Order Agaricales
Family Typhulaceae
Genus *Sclerotium*

ภาพที่ 2-6 อนุกรมวิธานของ *Sclerotium sp.* (Sacc, 1911)

รา *Sclerotium* จัดอยู่ในอันดับ Agaricales วงศ์ Typhulaceae ดังภาพที่ 2-6 โรครา เมล็ดผักกาด เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rofsi* ทำลายกล้วยไม้บริเวณรากหรือโคนต้น และลุกลามไปยังส่วนของลำต้นขึ้นไป ถ้าอากาศชื้นมากจะมีเส้นใยสีขาวแผ่ปกคลุมบริเวณโคนต้น บริเวณที่ถูกทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลตามลำดับ เนื้อเยื่อจะผุเปื่อย พร้อมกับมีเม็ดกลมขนาดเล็กสีน้ำตาลคล้ายเมล็ดผักกาดเกาะอยู่ตามโคนต้น เมื่ออากาศแห้งใบจะเหี่ยวและร่วงทำให้ต้นตาย

2.2.5. *Fusarium sacchari*

Domain Eukaryota
Kingdom Fungi
Division Ascomycota
Class Sordariomycetes
Order Hypocreales
Family Nectriaceae
Genus *Fusarium*
Species: *Fusarium sacchari*
(E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams, (1971)

ภาพที่ 2-7 อนุกรมวิธานของ *Fusarium sacchari*

รา *Fusarium sacchari* จัดอยู่ใน Genus *Fusarium* ดังภาพที่ 2-7 *Fusarium sp.* มีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญเติบโตเร็ว โคโลนีมีสีขาว และจะกลายเป็นสีม่วงเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ มี macroconidia ที่มีลักษณะเรียวแหลม โค้งงอ และมีผนังบาง และอาจมี sporodochia ที่มีสีส้มเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี มี microconia ที่มีลักษณะรี และเรียวแหลม ไม่มี chlamydospores และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคใบเน่าดำของกล้วยไม้สกุลหวาย (Leslie and Summerell, 2006)

2.3. การควบคุมโดยชีววิธี (biological control)

การควบคุมโดยชีววิธี เป็นการใช้ประโยชน์ของศัตรูธรรมชาติที่สำคัญได้แก่ parasites (ตัวเบียน) predators (ตัวห้ำ) และ pathogens (จุลินทรีย์) ในการรักษาระดับความหนาแน่นของประชากรของศัตรูพืช ชนิดใดชนิดหนึ่งให้อยู่ต่ำกว่าระดับที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต และการควบคุมโดยชีววิธีนี้เป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่อผลผลิต (สาทิพย์ มาลีและคณะ, 2558)

2.3.1. ประเภทของการควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี แบ่งตามการดำเนินการได้ดังนี้

1. การควบคุมโดยชีววิธีแบบธรรมชาติ คือการนำศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชที่พบในธรรมชาติแหล่งเดิม มาทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน และนำมาควบคุมในแหล่งเดิม
2. การควบคุมโดยชีววิธีแบบดั้งเดิม เป็นการนำศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชจากแหล่งที่อื่น ไปใช้ในแหล่งหนึ่ง ซึ่งต้องสอดคล้องกันในด้านต่าง ๆ เพื่อความยั่งยืนในการนำไปใช้
3. การควบคุมโดยชีววิธีแบบไม่ถาวร เป็นการใช้เทคนิควิธีต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมกับศัตรูพืช เพื่อลดความหนาแน่นของประชากรศัตรูพืช
4. การควบคุมโดยชีววิธีแบบร่วมสมัย เป็นการใช้สารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ จากสิ่งมีชีวิต ที่ไม่ใช่ยาฆ่าแมลง แต่สามารถใช้ควบคุมจำนวนประชากรศัตรูพืชได้ (สาทิพย์ มาลีและคณะ, 2558)

ในงานวิจัยนี้ได้จัดเป็นการศึกษาการควบคุมโดยชีววิธีแบบร่วมสมัย ซึ่งใช้ประโยชน์จากสารเมทาบอไลต์ (metabolites) หรือ lipopeptides จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ในการยับยั้งศัตรูของกล้วยไม้ ในที่นี้คือ เชื้อราก่อโรค เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราได้ จึงทำให้มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในพืชได้

2.4. *Bacillus sp.*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod shape) และสามารถสร้างสปอร์ ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจน (aerobes) หรือไม่ใช้ออกซิเจน (facultative anaerobes) ออกซิเจน (Turnbull, 1996) ในบรรดาตัวควบคุมทางชีววิธีแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ความสามารถ สังเคราะห์เอนไซม์และสารประกอบที่ยับยั้งเชื้อราในการยับยั้งโรคพืชได้ (Choub et al., 2021)

2.4.1. *Bacillus amyloliquefaciens*

Domain Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Bacillales

Family Bacillaceae

Genus Bacillus

Species *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987)

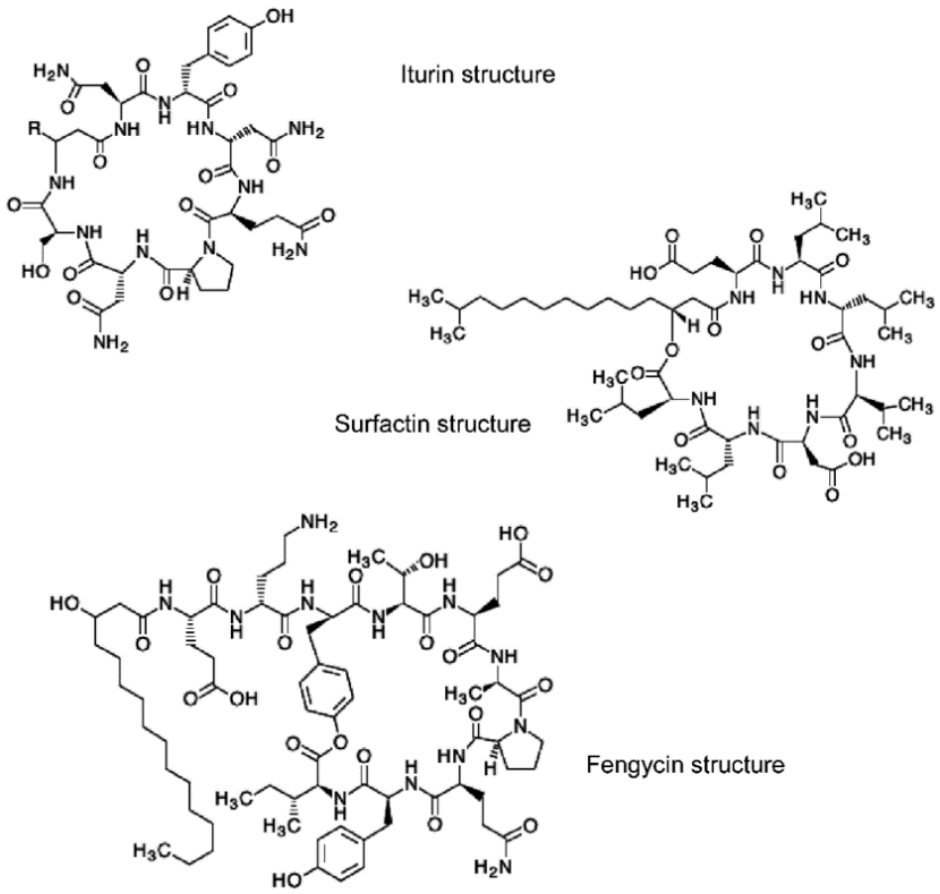
ภาพที่ 2-8 อนุกรมวิธานของ *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987)

Bacillus amyloliquefaciens ถูกค้นพบในปี 1943 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Fukumoto โดย *B. amyloliquefaciens* พบได้ทั่วไปในอาหาร พืช สัตว์ ดินและในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ *B. amyloliquefaciens* มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เป็นโปรไบโอติกและพรีไบโอติกในการหมัก และการสังเคราะห์สารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจาก *B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เปปไทด์ (peptide) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์สารต้านจุลชีพ เช่น Fengycin และ Bacillomycin ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดนี้มากยิ่งขึ้น *B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียที่ใช้งานได้หลากหลายและมีศักยภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (WoldemariamYohannes K. et al., 2020)

2.5. lipopeptide

lipopeptide คือสารเมทาบอไลต์ (metabolites) ที่สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ lipopeptide จาก *Bacillus* มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว มีโครงสร้างเป็นวง (cyclic) ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน (amino acid) 7 ถึง 10 ตัว รวมถึง กรดไขมันบีต้าไฮดรอกซี (beta-hydroxy fatty acid) 13 ถึง 19 คาร์บอนอะตอม ทำให้ lipopeptide มีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายประการ รวมถึงการมีปฏิสัมพันธ์กับร่างแหของจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะ หรือ biofilm นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า lipopeptide จาก *Bacillus* มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา (anti-fungal) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านการเกิดเนื้องอก (anti-tumor) รวมไปถึงการต้านไวรัส (anti-virus) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้นิยมใช้มากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นสารเคมีจากธรรมชาติสามารถย่อยสลายได้เร็ว มีความเป็นพิษต่ำ ทั้งยังเป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์อีกด้วย โดย surfactins,

fengycins และ iturins คือ lipopeptide จาก *Bacillus* ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากทั้ง 3 ประเภทนี้มีคุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) และพบได้มาก อย่างไรก็ตาม การที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ทำให้มีคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกัน (Zhao et al., 2017)



ภาพที่ 2-9 โครงสร้าง surfactins, fengycins และ iturins
(แหล่งที่มา: Mongkolthanaruk, 2012)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเตรียม lipopeptide จาก *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59

3.1.1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria Bertani (LB)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria Bertani (LB) medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน ในการเลี้ยงเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย ทำการเตรียมทั้งรูปแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง โดยมีรูปแบบอาหารเหลวส่วนประกอบได้แก่ tryptone 1 กรัม, yeast extract 0.5 กรัม และ NaCl 1 กรัม ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่ขวดแก้วขนาดเล็กฝาเกลียว (Vial) ขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที ส่วนรูปแบบอาหารแข็งทำการเพิ่ม agar 1.5 กรัม ลงในส่วนประกอบดังข้างต้น แล้วจึงนำไป autoclave จากนั้นนำอาหารที่ได้ไปเทลงบนเพลทเปล่าที่ปราศจากเชื้อ

3.1.2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Pretorios broth (PB)

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Pretorius broth (PB) ซึ่งได้ผ่านทำการทดสอบด้วยวิธีการ drop collapse test ว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถทำให้แบคทีเรียผลิตปริมาณ surfactant ได้มากที่สุด ซึ่ง lipopeptide เป็นสารในกลุ่ม surfactant จึงได้นำมาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้เกิดการผลิตสาร surfactant ที่ต้องการให้มากที่สุด โดย มีส่วนประกอบ ได้แก่ KH_2PO_4 1.02 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.006 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 1.32 กรัม, $CaCl_2$ 0.0018 กรัม, NH_4NO_3 1.2 กรัม, Glucose 0.6 กรัม, $MgSO_4$ 0.0435 กรัม, $MnSO_4.H_2O$ 0.0051 กรัม และ Yeast Extract 0.0375 กรัม ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที (Pretorius et al., 2015)

3.1.3. การผลิตสาร lipopeptide

นำ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59 ที่เก็บไว้เป็น stock ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายห่วง (loop) ที่เผาไฟจนเกิดเป็นสีแดงให้ทั่วทุกส่วนที่จะนำไปเขี่ยใน stock เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ต่อมานำเข็มเขี่ยเชื้อปลายห่วงที่เขี่ยสายพันธุ์ C59 นำไปจุ่มลงในขวดไวออลที่ใส่ LB broth 10 มิลลิลิตร เมื่อเสร็จเผาปากขวดแล้วปิดฝา แล้วนำผ่านไฟบริเวณฝาอีกรอบ แล้วนำเข้าตู้บ่มแบบเขย่า (shaking incubator) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 280 rpm เวลาเป็น 24 ชั่วโมง

นำ LB broth ที่ผสมสายพันธุ์ C59 ออกมาเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) แล้วใช้ไมโครปิเปตต์ขนาด 1,000 ไมโครลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 800 ไมโครลิตรเพื่อปิเปตต์ LB broth ที่ผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 ลงในคิวเวทแก้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบว่ามีค่าเท่ากับ 1.0 หรือไม่ โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ทดสอบโดยใช้กดปุ่ม basic ATC ทำการตั้งค่าความยาวคลื่นเป็น 600 นาโนเมตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง blank ก่อน คือ LB broth เปล่า เพื่อให้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงเฉพาะของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ค่าน้อยมากกว่า 1.0 ให้ทำการเพิ่มระยะเวลาการเขย่าอีก 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง ถ้าไม่ได้ค่าเท่ากับ 1.0 ทำการลงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 ใน LB broth เปล่า ขวดใหม่

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ค่ามากกว่า 1.0 ให้ทำการเจือจางด้วย LB broth เปล่า แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงใหม่ จนว่าจะมีค่าเท่ากับ 1.0

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ค่าเท่ากับ 1.0 ทำการปิเปตต์ LB broth ที่ผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 ลง Pretorius broth (PB) เพื่อผลิตสาร lipopeptide

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ค่าเท่ากับ 1.0 ต่อจากนั้นปิเปตต์ 3 มิลลิลิตรของ LB broth ที่ผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 ใส่ลงใน PB ซึ่งเป็นปริมาตร 1 ใน 50 เท่าของปริมาตร Pretorius broth (PB) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าตู้บ่มแบบเขย่า โดยตั้งอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 280 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาเซลล์แบคทีเรียออกโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้แบคทีเรียเกิดการตกตะกอนและรวมตัวกันแน่นในก้นขวด จากนั้นทำการเตรียม lipopeptide ปลอดเชื้อแบคทีเรีย 2 รูปแบบ ได้แก่ การกรองและ autoclave

1. lipopeptide ปลอดเชื้อแบบกรอง นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเทลงในเครื่องกรองที่ใส่แผ่นกรอง (filter) ขนาด 1.2 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อ ทำการกรอง 2 ครั้ง และเทใส่เครื่องกรองที่ใส่แผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อ ทำการกรอง 1 ครั้ง เมื่อเสร็จนำไมโครปิเปตต์ขนาด 1,000 ไมโครลิตร มาปิเปตต์สารที่กรองได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเพลท LB agar รอจนสารแห้งแล้วพันพาราฟิล์มรอบเพลท นำเข้าตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูสารที่กรองได้ไม่มีปนเปื้อนของแบคทีเรีย ถ้ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียบนเพลท ทำการกรองผ่านเครื่องกรองที่ใส่แผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อและทำการทดสอบสารที่กรองได้อีกครั้ง ถ้าไม่มีการปนเปื้อน สาร lipopeptide ที่กรองได้พร้อมนำไปใช้งาน

2. lipopeptide ปลอดเชื้อแบบ autoclave นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเทลงในรูปชมพู่ แล้วปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟรอยด์ แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นพร้อมนำไปใช้งาน

3.2. วัดปริมาณการผลิตสาร lipopeptide ด้วย drop collapse test

3.2.1. การทำกราฟมาตรฐานของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร lipopeptide

สร้างกราฟมาตรฐานของขนาดหยดด้วยวิธีการ drop collapse test เพื่อเปรียบเทียบแต่ละการทดลองว่าขนาดหยดที่วัดได้ค่าต่าง ๆ แสดงถึงสารมีปริมาณความเข้มข้นเป็นเท่าใด โดยใช้ SDS เป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิว ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยนำ 10% (w/v) SDS มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 และ 0% (w/v) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์ปิเปตต์ 0.1% (w/v) bromophenol blue 1 ไมโครลิตรแล้วนำไปหยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม และปิเปตต์ SDS แต่ละความเข้มข้นมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปหยดบน bromophenol blue ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายภาพด้วยโปรแกรม panasis และวัดขนาดของหยดเป็นพิกเซล (pixels) ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop 2021 จากนั้นนำข้อมูลขนาดหยดที่ได้วัดไปสร้างกราฟมาตรฐาน SDS ด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อหาเส้นแนวโน้มแบบเส้นตรง (linear) และสมการเส้นตรง ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น SDS กับขนาดของหยด lipopeptide ที่ผลิตขึ้น

3.2.2. วัดความสามารถในการกระตุ้นการผลิตสาร lipopeptide ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Pretorios broth (PB) โดย drop collapse test

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C59 เลี้ยงใน PB ที่ผ่านตู้บ่มแบบเขย่า อุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 280 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ lipopeptide 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นหยดสี 0.1% (w/v) bromophenol blue 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ 0.5 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นเป็นตัวควบคุมแบบบวก และใช้น้ำกลั่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PB เปล่า เป็นตัวควบคุมแบบลบ แล้วถ่ายภาพด้วยโปรแกรม panasis และวัดขนาดของหยดเป็นพิกเซล (pixels) ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop 2021 ทำการทดลอง 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของหยดของ lipopeptide แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานของ SDS เพื่อดูว่าสาร lipopeptide ที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเป็นเท่าใด

3.3. การเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเชื้อราก่อโรค 5 ชนิด

นำหลอดที่ใส่กระดาษของเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ได้แก่

1) *Colletotrichum sp.*
2) *Phyllosticta sp.*
3) *Cladosporium sp.*
4) *Sclerotium sp.*
5) *Fusarium sacchari*

นำไปเลี้ยงเพื่อใช้เป็น stock เพื่อให้เชื้อราที่นำมาใช้มีคุณสมบัติและความสามารถในการเพิ่มจำนวนเหมือนเดิม โดยจะทำการเลี้ยงเชื้อราบนเพลท potato dextrose agar (PDA)

ขั้นตอนการเตรียม stock เชื้อรา คือ การเตรียมทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) โดยใช้คีมหนีบแสตนเลส (forceps) จุ่ม 95% แอลกอฮอล์แล้วเผาไฟจนร้อน 4 ครั้ง แล้วรออุณหภูมิเย็นลง นำไปคีบกระดาษที่มีเชื้อราอยู่ในหลอด นำมาวางตรงกลางของเพลท PDA แล้วปิดฝาแพลท นำคีมจุ่ม 95% แอลกอฮอล์ ใช้พาราฟิล์มพันรอบเพลทและเขียนรายละเอียดต่าง ๆ นำเพลทไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราเติบโตจนเกือบเต็มเพลท แล้วนำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมเชื้อราทั้ง 5 ชนิดทำในรูปแบบเดียวกัน

การเพิ่มจำนวนเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ใช้วิธีเพิ่มจำนวนเชื้อราจาก stock (subculture) เนื่องจากเป็นวิธีนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและทำได้ง่าย อีกทั้งยังทำให้เชื้อรา stock เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ลดการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้น

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเชื้อรา คือ การเพิ่มจำนวนทำในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (needle) แล้วเผาไฟจนร้อนแดง 3 ครั้ง แล้วรออุณหภูมิเย็นลง นำไปเขี่ยที่ขอบเส้นใยของเชื้อรา (hypha) ในเพลทเชื้อราที่เป็น stock แล้วนำมาวางตรงกลางของเพลท PDA เปล่าที่เตรียมไว้ แล้วปิดฝาแพลท ใช้พาราฟิล์มพันรอบเพลทและเขียนรายละเอียดต่าง ๆ นำเพลทไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกว่าเชื้อราเจริญโตจนเกินครึ่งเพลท แล้วนำเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้การทดลองขั้นต่อไป การเพิ่มจำนวนเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ทำในรูปแบบเดียวกัน

3.4. การทดสอบประสิทธิภาพของสาร lipopeptide ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด

3.4.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารที่สร้างว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราหรือไม่ โดยจะทำการผสมสาร lipopeptide ต่อสัดส่วนของน้ำกลั่นในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA) เพื่อสร้างเป็นเพลทเลี้ยงเชื้อราทั้งหมด 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 1. ชุดควบคุม (control) 2. lipopeptide 10% 3. lipopeptide 30% และ 4. lipopeptide 50% รายละเอียดดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 อัตราส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

อาหารเลี้ยงเชื้อรา	PDA	น้ำกลั่น	lipopeptide
ชุดควบคุม	100%	100%	0%
lipopeptide 10%	100%	90%	10%
lipopeptide 30%	100%	70%	30%
lipopeptide 50%	100%	50%	50%

ขั้นตอนการเตรียมเริ่มจาก เตรียม PDA 10.14 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 260 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำเข้าตู้ไมโครเวฟทำการอุ่นจนเห็นลักษณะของวุ้นใสและละลายจนหมด แบ่ง PDA ที่ได้เทลงใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขวดละ 65 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด แล้วเขียนรายละเอียดแต่ละขวด ขวดที่ 1 เป็น control ขวดที่ 2 เป็น lipopeptide 10% ขวดที่ 3 เป็น lipopeptide 30% ขวดที่ 4 เป็น lipopeptide 50% เติมน้ำกลั่นปริมาตรต่าง ๆ ลงในแต่ละขวด

- ขวดที่ 1 control เติมน้ำกลั่นปริมาตร 65 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 2 lipopeptide 10% เติมน้ำกลั่นปริมาตร 52.5 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 3 lipopeptide 30% เติมน้ำกลั่นปริมาตร 27.5 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 4 lipopeptide 50% ไม่ต้องเติมน้ำกลั่น

จากนั้นทำทั้งหมด แบ่งใส่ลงในขวดแก้วมีฝาปิดขนาดเล็ก 25 มิลลิลิตร

- ขวดที่ 1 control แบ่งใส่ 5 ขวด ปริมาตรขวดละ 25 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 2 lipopeptide 10% แบ่งใส่ 5 ขวด ปริมาตรขวดละ 23.5 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 3 lipopeptide 30% แบ่งใส่ 5 ขวด ปริมาตรขวดละ 18.5 มิลลิลิตร
- ขวดที่ 4 lipopeptide 50% แบ่งใส่ 5 ขวด ปริมาตรขวดละ 12.5 มิลลิลิตร

โดยแต่ละขวดทำการติดฉลากและเขียนรายละเอียดตามขวดที่แบ่งออกมา แล้วนำทั้งหมดไปทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อเสร็จนำทั้งหมดออกมาไว้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันวุ้นแข็งตัวและเตรียมผสม lipopeptide ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 5.0% SDS โดยทำการทดสอบ drop collapse test วัดขนาดของหยด lipopeptide เทียบกับสมการกราฟมาตรฐานมีความเข้มข้นเทียบเท่ากี่ %SDS ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 5.0%SDS ทำการเจือจางด้วย PB มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.0%SDS ในแต่ละรอบลงในไปในแต่ละขวดในตู้ปลอดเชื้อ

- ขวด control ไม่ต้องใส่ lipopeptide

- ขวด lipopeptide 10% ใส่ lipopeptide ปริมาตรขวดละ 2.5 มิลลิลิตร
- ขวด lipopeptide 30% ใส่ lipopeptide ปริมาตรขวดละ 7.5 มิลลิลิตร
- ขวด lipopeptide 50% ใส่ lipopeptide ปริมาตรขวดละ 12.5 มิลลิลิตร

ผสมแต่ละขวดให้เข้ากัน แล้วเทใส่เพลทเปล่าที่ปราศจากเชื้อ รอจนวุ้นแข็งตัว เขียนรายละเอียดตามขวดที่เทออกมา เขียนบริเวณขอบเพลทและทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อ 48 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่การปนเปื้อนเกิดขึ้น

3.4.2. การทดสอบยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide

ทำการเลี้ยงเชื้อราลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ที่เตรียมไว้ โดยเชื้อราทั้ง 5 ชนิด แต่ละชนิดเลี้ยงบนเพลททั้ง 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 1. ชุดควบคุม (control) 2. lipopeptide 10% 3. lipopeptide 30% และ 4. lipopeptide 50% เพื่อดูการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนการทดสอบ คือ ทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยนำเพลทที่เลี้ยงเพิ่มจำนวนของเชื้อราแต่ละชนิดมา แล้วใช้ cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตรหรือหลอดกาแฟตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาตัดตรงบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา จากนั้นนำไปวางตรงกลางเพลททั้ง 4 ความเข้มข้น โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายตรง (needle) ที่เผาไฟจนแดง 3 รอบและรอจนอุณหภูมิเย็นลง แทงลงไปในหลอดเพื่อให้ส่วนที่ตัดออกมาไปหลุดออกไปอยู่ตรงกลางเพลท เสร็จแล้วปิดฝา เขียนรายละเอียดเชื้อราแต่ละชนิดบริเวณขอบเพลท แล้วพันพาราฟิล์ม ทำเชื้อราทั้ง 5 ชนิดทำในรูปแบบเดียวกันและนำเพลททั้งหมดใส่ในกล่องพลาสติก แล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกภาพเพลททุก 1, 3, 7 และ 14 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำเพื่อนำไปวัดขนาดของรัศมีการเจริญเติบโตของเชื้อรา

โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา = $(R - r)/R \times 100$

R คือ รัศมีของเชื้อราชุดควบคุม และ

r คือ รัศมีของเชื้อราในแต่ละเปอร์เซ็นต์ของ lipopeptide

นำค่าที่ได้ไปทดสอบทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel หาค่าเฉลี่ย (Mean), ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S.E.) ของข้อมูล และทำการแสดงข้อมูลเป็นภาพเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้น lipopepide

3.4.3. การทดสอบเชิงสถิติของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อราแต่ละชนิด

การทดสอบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์, 30 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ในเชื้อราแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ทดสอบโดยใช้โปรแกรม SPSS

เริ่มทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลว่ามีการกระจายตัวแบบใด สังเกตจากค่า Sharpiro wilk test กำหนดให้ *P* value เท่ากับ 0.05

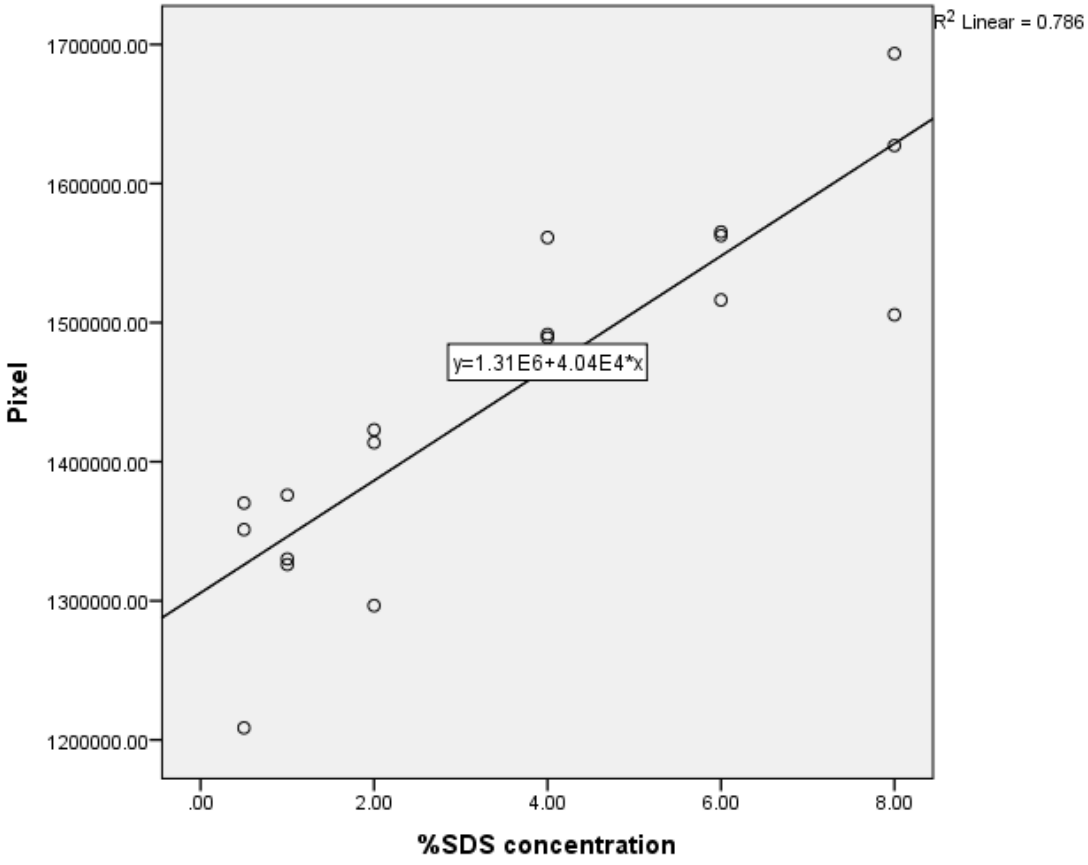
ถ้าข้อมูลมีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าการกระจายตัวของข้อมูลว่ามีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-parametric) สามารถวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Kruskal-Wallis test ตรวจสอบความแตกต่างของข้อมูลของข้อมูล (Post hoc test) จาก Mann whitney U

ถ้าข้อมูลมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าการกระจายตัวของข้อมูลว่ามีการกระจายตัวแบบปกติ (Parametric) นำข้อมูลไปทดสอบความแปรปรวนของข้อมูลจาก test of homogengeity of variences กำหนดให้ sig = 0.05 ถ้าข้อมูลมีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของข้อมูลเท่ากัน สามารถวิเคราะห์ข้อมูลโดย one-way ANOVA และตรวจสอบความแตกต่างของข้อมูลของข้อมูลจาก Waller-Duncan test ถ้าข้อมูลมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของข้อมูลไม่เท่ากัน สามารถวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Kruskal-Wallis test ตรวจสอบความแตกต่างของข้อมูลของข้อมูลจาก Mann whitney U

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1. กราฟมาตรฐานของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร lipopeptide

สร้างกราฟมาตรฐานของขนาดหยดด้วยวิธีการ drop collapse test ใช้ SDS เป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิว มีความเข้มข้นเป็น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 และ 0% (w/v) หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น SDS กับขนาดของหยดที่เกิดขึ้นเป็นสมการเส้นตรง y = 40367x + 1305808 ดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานระหว่างขนาดหยดและความเข้มข้นของ Sodium dodecyl sulfate (SDS) กราฟมาตรฐานแบบ scatter plot ระหว่างขนาดหยดในหน่วยพิเซลและ SDS ความเข้มข้นเป็น 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 และ 0% (w/v) โดยมีสมการเส้นตรง y = 40367x + 1305808 และมีค่า R-square = 0.786 การทดลอง 3 ซ้ำ

4.2. การทดสอบยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด

4.2.1. การทดสอบวันที่ 1

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 21.84±1.71%, 13.11% และ 26.20±4.32% ตามลำดับ ที่ lipopeptide ที่ความเข้มข้น 30% มีผลการทดลองแค่ 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 16.56±0.93%, 31.38±4.60% และ 33.49±4.53% ตามลำดับ

- *Colletrotrichum* sp.

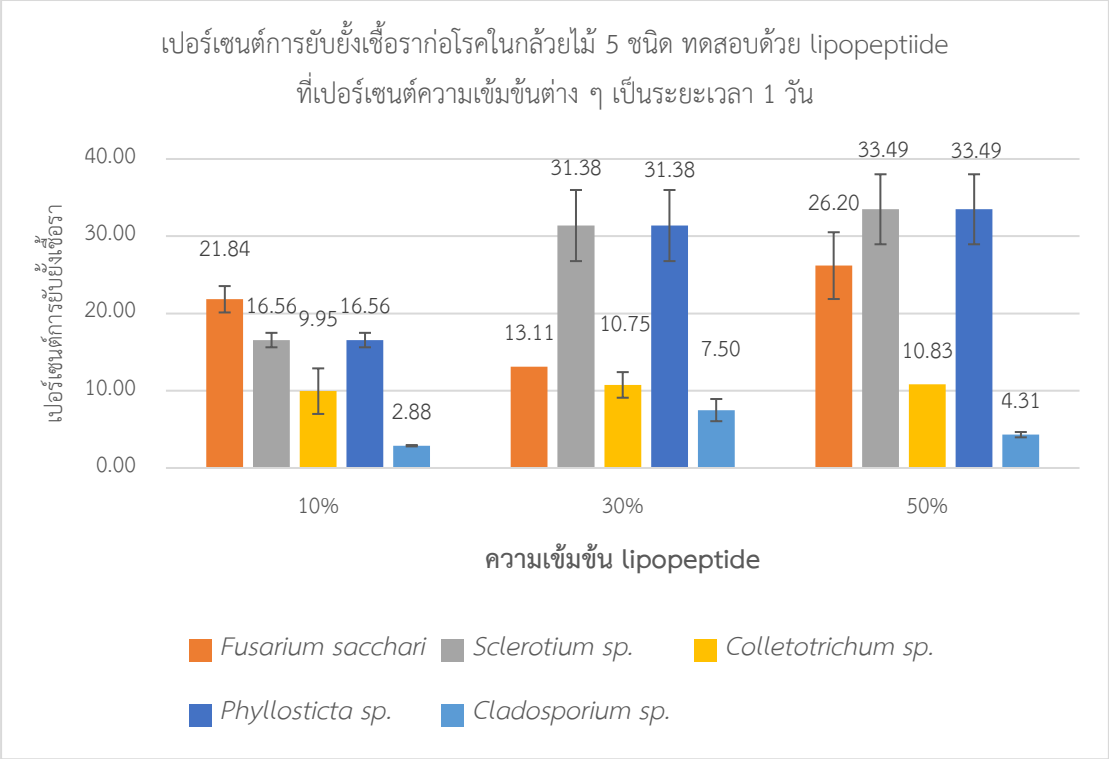
พบว่า lipopeptide ที่เความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 9.95±2.95%, 10.75±1.66% และ 10.83% ตามลำดับ โดยที่ lipopeptide ที่ความเข้มข้น 50% มีผลการทดลองแค่ 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 16.56±0.93%, 31.38±4.60% และ 33.49±4.53% ตามลำดับ

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 2.88±0.09%, 7.50±1.44% และ 4.31±0.34% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรองที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *F. sacchari* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์, เชื้อรา *Colletotrichum* ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 1 ซ้ำ แสดงข้อมูล standard error (S.E.)

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 11.87%, 14.69% และ 14.68% ตามลำดับ โดยมีผลการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 13.07%, 12.24% และ 8.09% ตามลำดับ โดยมีผลการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Colletrotrichum* sp.

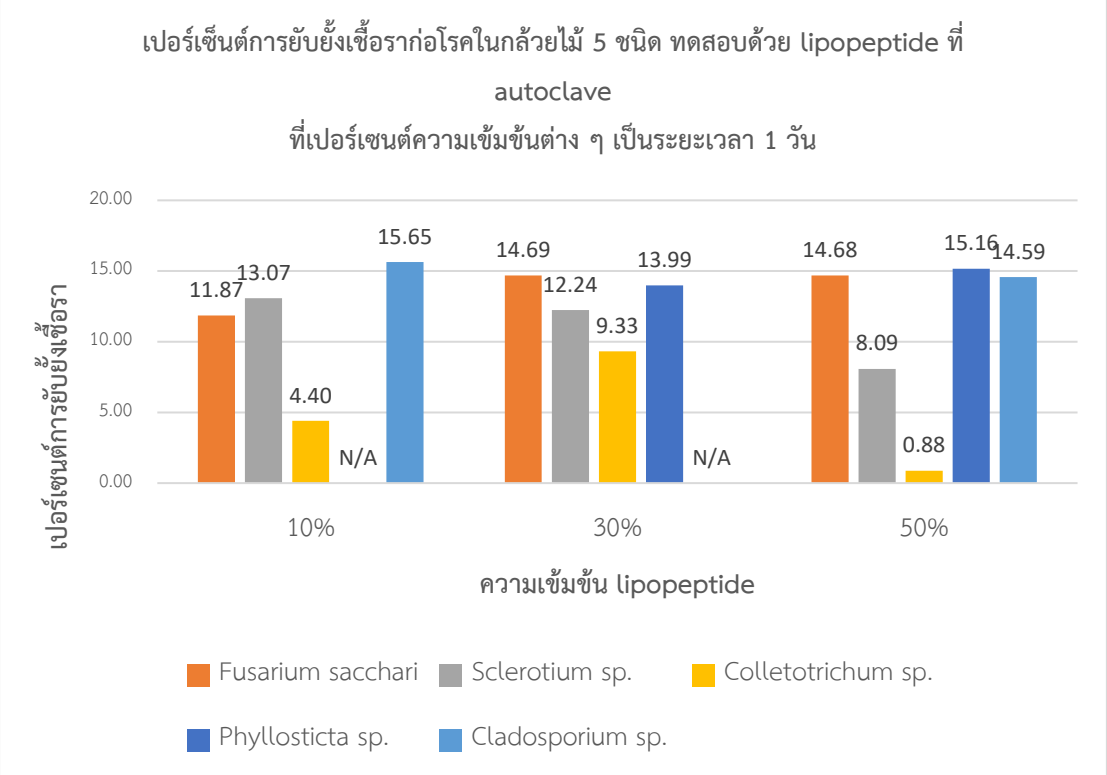
พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 4.40%, 9.33% และ 0.88% ตามลำดับ โดยมีผลการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 13.99% และ 15.16% ตามลำดับ โดยมีผลการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์และเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้ทำการเก็บข้อมูลเนื่องจากการปนเปื้อนทำให้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 0% เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 15.65% และ 14.59% ตามลำดับ โดยมีผลการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์และเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้ทำการเก็บข้อมูลเนื่องจากการปนเปื้อนทำให้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 0% เหมือนกันทุกระยะเวลา (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการ

ทดลอง 1 ซ้ำ ยกเว้น *Phyllosticta* sp. ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และ *Cladosporium* sp. ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ไม่มีข้อมูล

4.2.2. การทดสอบวันที่ 3

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 17.29±2.37%, 15.51% และ 42.59±2.60% ตามลำดับ

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 49.31±1.03%, 76.22±0.29% และ 78.80±1.88% ตามลำดับ

- *Colletrotrichum* sp.

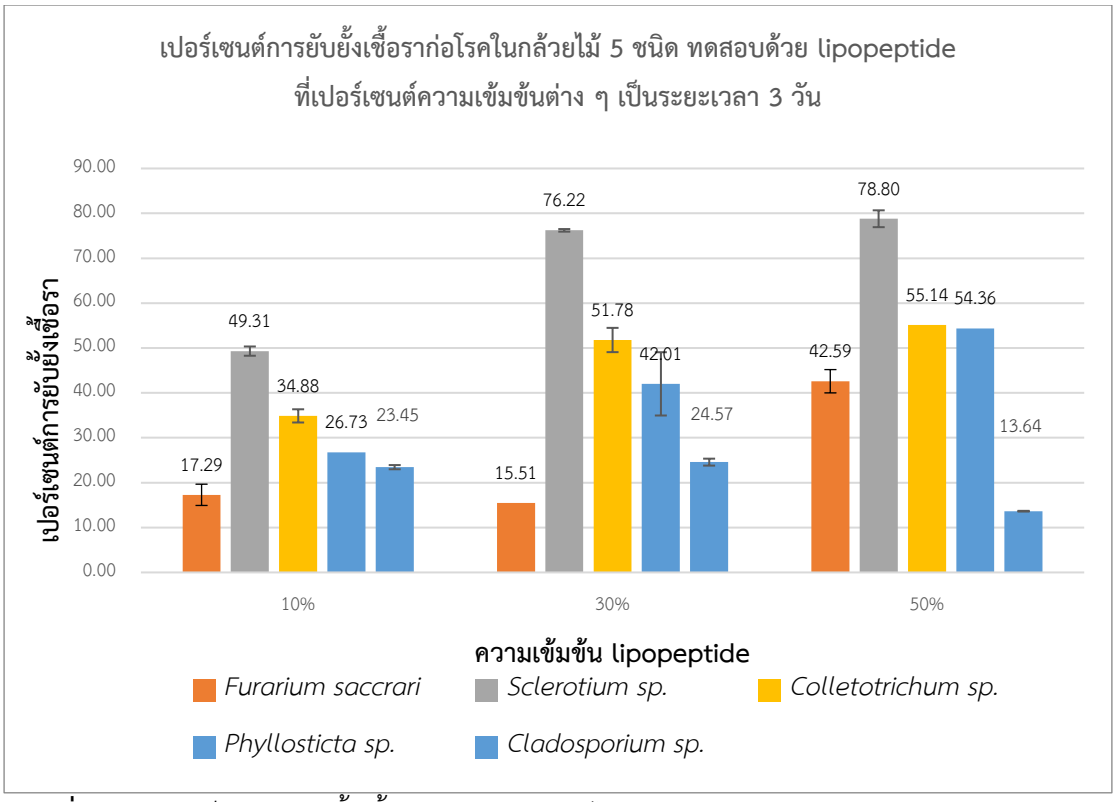
พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 34.88±1.47%, 51.78±2.70% และ 55.14% ตามลำดับ

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 26.73%, 42.01±7.05% และ 54.36% ตามลำดับ โดยที่ lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 เปอร์เซ็นต์มีผลการทดลองแค่ 1 ซ้ำ ทำให้มีค่า standard error (S.E.) เท่ากับศูนย์เหมือนกันทุกระยะเวลา

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 23.45±0.47%, 24.57±0.77% และ 13.64±0.08% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรองที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *F. sacchari* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์, เชื้อรา *Colletotrichum* ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 1 ซ้ำ แสดงข้อมูล standard error (S.E.)

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 11.23%, 32.40% และ 37.55% ตามลำดับ

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 13.38%, 40.27% และ 45.22% ตามลำดับ

- *Colletrotrichum* sp.

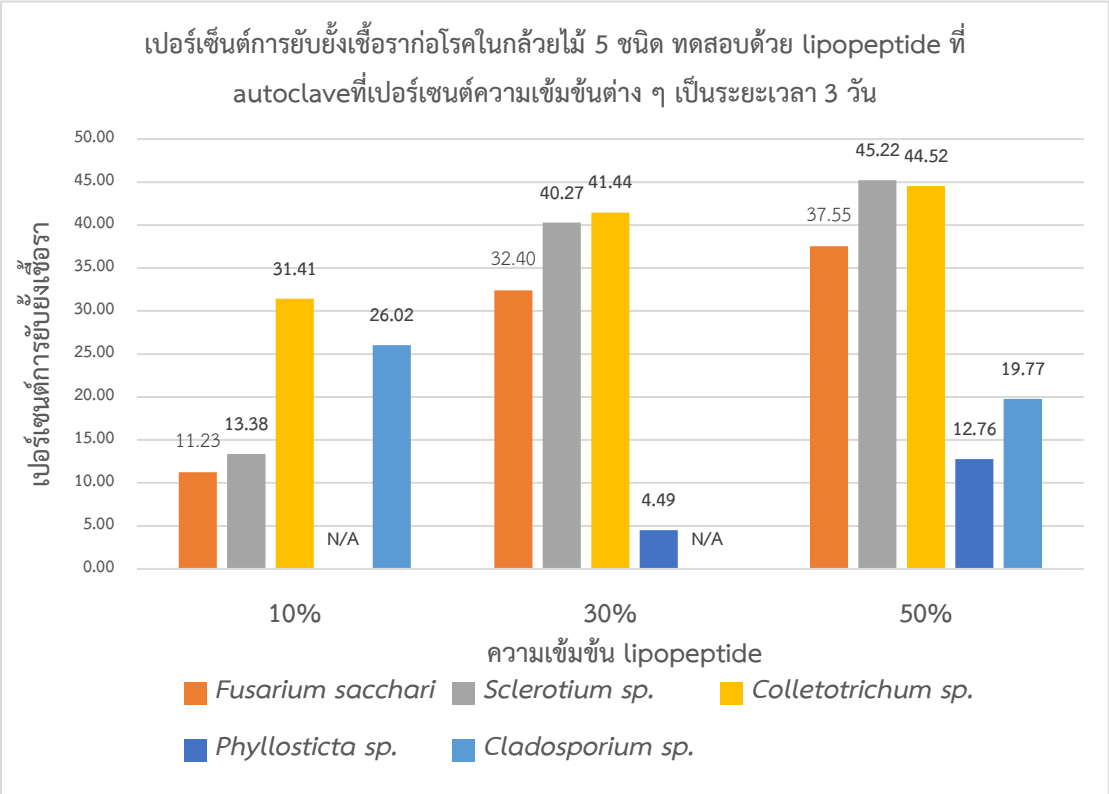
พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 31.41%, 41.44% และ 44.52% ตามลำดับ

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 4.49% และ 12.76% ตามลำดับ

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 26.02% และ 19.77% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Cladosporium* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ไม่มีข้อมูล

4.2.3. การทดสอบวันที่ 7

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ชนิดนี้ เท่ากับ 17.21±0.98%, 19.74% และ 33.16±0.81% ตามลำดับ

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 17.57±2.09%, 62.82±2.65% และ 87.17±2.43% ตามลำดับ

- *Colletotrichum* sp.

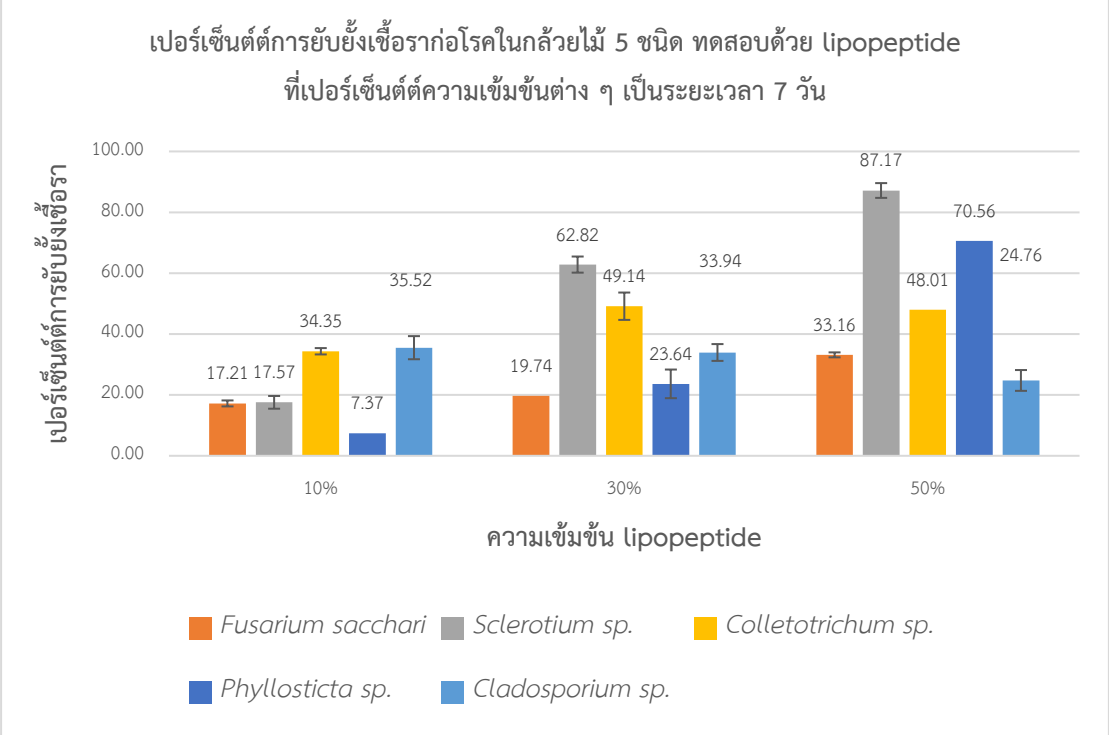
พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ชนิดนี้ เท่ากับ 34.35±1.04%, 49.14±4.49% และ 48.01% ตามลำดับ

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 7.37%, 23.64±4.70% และ 70.56% ตามลำดับ

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา ชนิดนี้ เท่ากับ 35.52±3.80%, 33.94±2.76% และ 24.76±3.42% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรองที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วันทำการทดลอง 2 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *F. sacchari* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์, เชื้อรา *Colletotrichum* ที่

ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 1 ซ้ำ แสดงข้อมูล standard error (S.E.)

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave

- *Fusarium sacchari*

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 21.37%, 40.06% และ 46.98% ตามลำดับ

- *Sclerotium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 0.52%, 9.56% และ 65.729% ตามลำดับ

- *Colletrotrichum* sp.

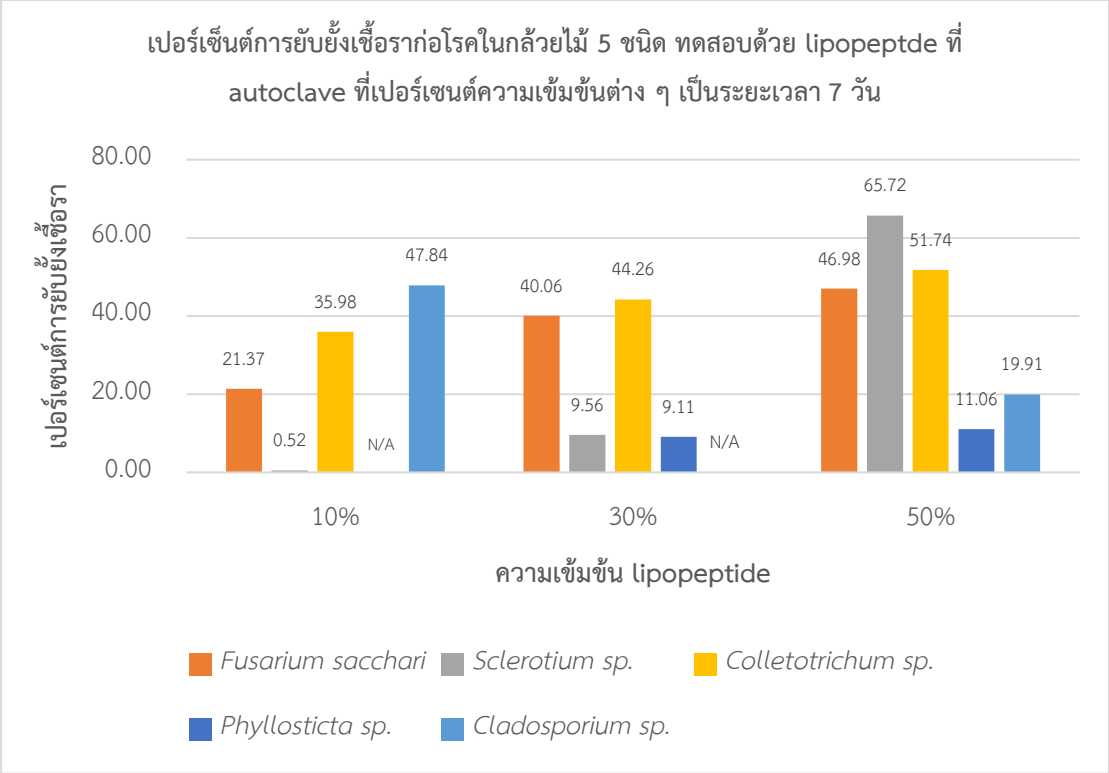
พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 35.98%, 44.26% และ 51.74% ตามลำดับ

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 9.11% และ 11.06% ตามลำดับ

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 47.84% และ 19.91% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-7)



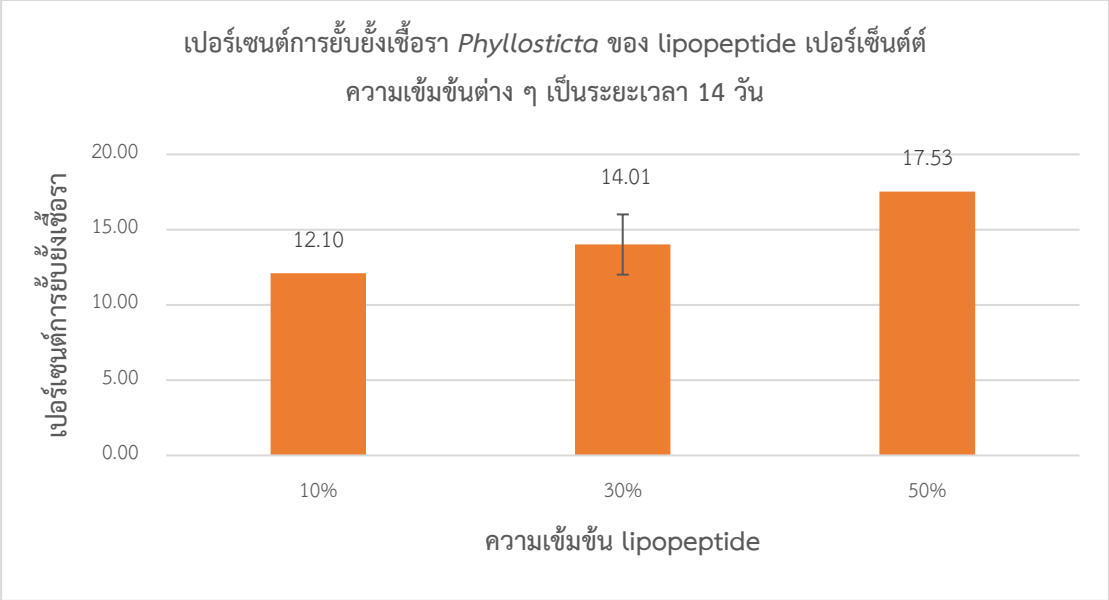
ภาพที่ 4-7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิด ทดสอบด้วย lipopeptde ปลอดเชื้อโดยการ autoclave เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และเชื้อรา *Cladosporium* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ไม่มีข้อมูล

4.2.4. การทดสอบวันที่ 14

Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรอง

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 10%, 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 12.10%, 14.01±2.00% และ 17.53% ตามลำดับ



ภาพที่ 4-8 เปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Phyllosticta* ของ lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการกรองที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 1 ซ้ำ แสดงข้อมูล standard error (S.E.)

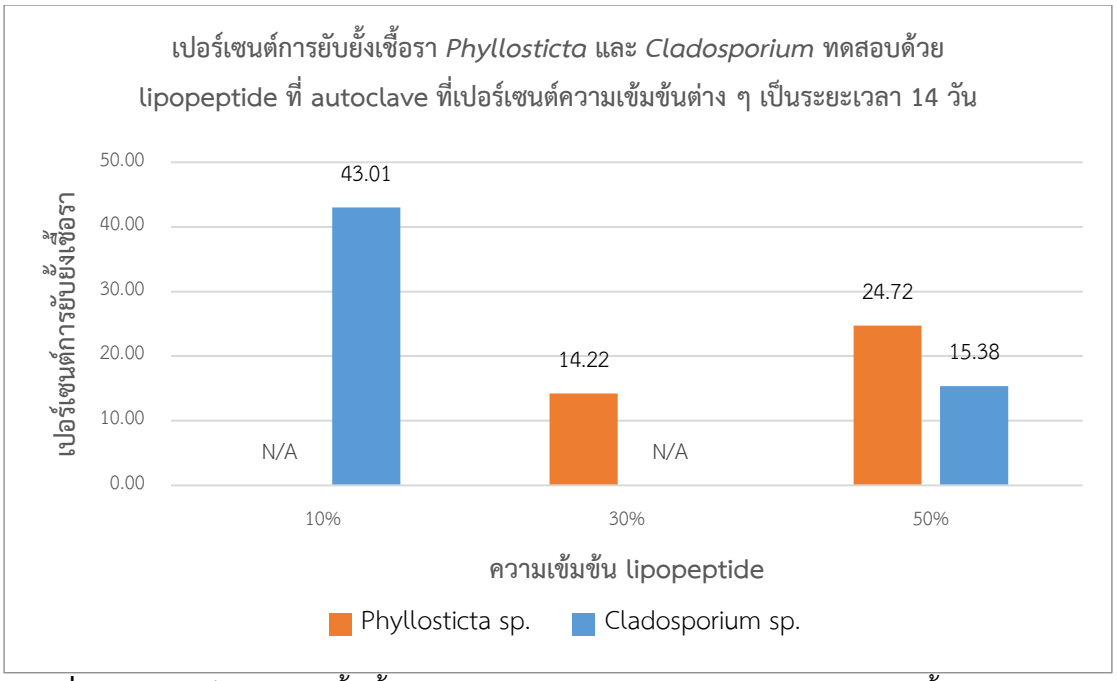
Lipopeptide ปลอดเชื้อโดยการ autoclave

- *Phyllosticta* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 30% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 14.22% และ 24.72% ตามลำดับ

- *Cladosporium* sp.

พบว่า lipopeptide ที่ autoclave ที่ความเข้มข้น 10% และ 50% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ เท่ากับ 43.01% และ 15.38% ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta* และ *Cladosporium* ปลอดเชื้อโดยการ autoclave ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการทดลอง 1 ซ้ำ ยกเว้นเชื้อรา *Phyllosticta* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และเชื้อรา *Cladosporium* ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ไม่มีข้อมูล

4.3. การทดสอบเชิงสถิติของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด เทียบกับในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide

การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลจาก Shapiro-Wilk test พบว่าเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มีค่า *P* value มากกว่า 0.05 แสดงว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 4-1 จึงต้องใช้สถิติแบบ Non-Parametric test คือ Non-Parametric Statistics โดยใช้ Kruskal Wallis test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นของ lipopeptide และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด (ตารางที่ 4-2)

Kruskal Wallis test เปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดกับทุกความเข้มข้นของ lipopeptide พบว่าเชื้อราทั้ง 5 ชนิดในแต่ละช่วงเวลาทดสอบมีค่า *P* value มากกว่า 0.05 แสดงว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ทุกความเข้มข้นของ lipopeptide ในแต่ละช่วงเวลาการทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-1 การทดสอบการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด

Shapiro-Wilk	
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา	*P* value
Fusarium sacchari	0.147
Sclerotium sp.	0.338
Cladosporium sp.	0.319
Colletotrichum sp.	0.053
Phyllosticta sp.	0.838

ตารางที่ 4-2 Kruskal Wallis test เปรียบเทียบระหว่างเชื้อราแต่ละชนิดกับความเข้มข้นของ lipopeptide ในแต่ละช่วงเวลา

เชื้อรา	**วัน**	***P* value**
Fusarium saccari	1	0.284
	3	0.225
	7	0.202
Sclerotium sp.	1	0.170
	3	0.158
	7	0.149
Colletotrichum sp.	1	0.277
	3	0.238
	7	0.202
Phyllosticta sp.	1	0.194
	3	0.189
	7	0.280
	14	0.428
Cladosporium sp.	1	0.143
	3	0.155

	7	0.215
	14	0.368

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาการทดสอบยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกล้วยไม้ 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพของสาร lipopeptide ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C59 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแต่ละเชื้อราใน 5 ชนิดที่ก่อโรคในกล้วยไม้ โดยเปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของ lipopeptide 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์, 30 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบระยะเวลาที่ lipopeptide ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ 1, 3, 7 และ 14 วัน โดยสามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของ lipopeptide พบว่า lipopeptide ที่ความเข้มข้น 50% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Fusarium sacchari* ได้ดีที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.14% และ 42.59% ขณะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta* sp. และ *Sclerotium* sp. ได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.56% และ 87.17% ส่วน lipopeptide ที่ความเข้มข้น 10% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 35.52% อย่างไรก็ตามสารที่นำมาใช้มีสารอื่นที่แบคทีเรียผลิตปนมาอยู่ด้วยซึ่งอาจเป็นสารที่ไปรบกวนกระบวนการการยับยั้งเชื้อราแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา

ในงานวิจัยของ Choub และคณะ (2021) ที่ได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ด้วยสาร lipopeptide ที่สกัดจาก *B. velezensis* CE 100 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 50% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่ 75 % ซึ่งมากกว่าผลการทดสอบในครั้งนี้ที่มีการยับยั้งคือ 48.01%

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วย lipopeptide ที่ผ่านการ autoclave และ ที่ไม่ผ่านการ autoclave พบว่า *F. saccari* ที่ผ่านการ autoclave ในวันที่ 1 มีประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง 11.51% *Sclerotium* sp. ที่ผ่านการ autoclave ในวันที่ 7 มีประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง 53.27% *colletotrichum* sp. ที่ผ่านการ autoclave ในวันที่ 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง 10.62% *Phyllosticta* sp. ที่ผ่านการ autoclave ในวันที่ 7 มีประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง 59.50% ในขณะที่ *Cladosporium* sp. ที่ผ่านการ autoclave ในวันที่ 1 มีประสิทธิภาพในเพิ่มขึ้น 12.76% จากผล

การทดสอบการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด จาก lipopeptide ที่ผ่านการ autoclave พบว่า ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราลดลง เนื่องจาก lipopeptide จะเกิดการเสื่อมสภาพเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส (Chen et al., 2017)

กลไกการทำงานของ lipopeptide มีหลายวิถี เช่น oxidative stress, osmotic stress, apoptosis และทำลาย cytoskeleton และทำให้เกิดความผิดปกติของ cell metabolism ซึ่งส่วนใหญ่จะมีเพียงกลไกเดียว แต่ทำให้เกิดผลต่อหลายโครงสร้าง ยกตัวอย่าง Iturin จะทำให้เกิด oxidative stress จากการสะสม reactive oxygen species (ROS) และมีปฏิสัมพันธ์กับ cell membrane ของเป้าหมายและควบคุมปริมาณโปรตีน ทำให้ cell wall ฉีกขาดได้ พอผนังเซลล์ฉีกขาด ทำให้ของเหลวข้างในเกิดการรั่วไหลออกมา จึงเกิด osmotic stress มากไปกว่านั้น Iturin ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกลไกการป้องกันเชื้อราของพืช ซึ่งวิถีนี้เป็นบทบาทสำคัญในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของ iturin (Li, T. et al., 2021)

จากการทดลองพบว่า lipopeptide ในสารคัดหลั่งที่สกัดจาก *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ โดยมีความสามารถในการยับยั้งไม่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้น จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2014) ได้สกัด lipopeptide จาก *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWB16 พบว่ามี lipopeptide ชนิด Iturin โดย Iturin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยทำให้เชื้อราเกิด oxidative stress จากการสะสม reactive oxygen species (ROS) และส่งผลต่อ cell membrane ของเป้าหมายและควบคุมปริมาณโปรตีนทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาด เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์ก่อให้เกิด osmotic stress (Han et al., 2015)

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลทดสอบประสิทธิภาพของ lipopeptide ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 5 ชนิดที่ก่อโรคในกล้วยไม้ ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp., *Cladosporium* sp., *Sclerotium* sp. และ *Fusarium sacchari* สามารถสรุปได้ว่า lipopeptide ที่ไม่ผ่านการ autoclave สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 5 ชนิด โดยสามารถยับยั้ง *Sclerotium* sp. ได้มีประสิทธิภาพที่สุดในวันที่ 7 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.17±2.43% รองลงมาเป็น *Phyllosticta* sp. ในวันที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.56% ในขณะที่ *Colletotrichum* sp., *F. Sacchari* และ *Cladosporium* sp. สามารถยับยั้งได้บางส่วน โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.14% ในวันที่ 3 , 42.59±2.60% ในวันที่ 3 และ 35.52±3.80% ในวันที่ 7 ตามลำดับ การยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด จาก lipopeptide ที่ผ่านการ autoclave พบว่า ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราลดลง เนื่องจาก lipopeptide จะเกิดการเสื่อมสภาพเมื่อผ่านอุณหภูมิสูง

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ Kruskal Wallis test พบว่าความแตกต่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์, 30 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของ *Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp., *Cladosporium* sp. *Sclerotium* sp. และ *F. sacchari* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการเตรียมเพลท lipopeptide ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ต้องทำในสภาวะที่ปลอดเชื้อสูงและต้องเตรียมอาหารอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน อีกทั้งในระหว่างการทดสอบมีการตรวจสอบสม่ำเสมอเพื่อเก็บผลการทดลอง และมีการปนเปื้อนในภายหลังควรรีบแก้ไขทันที เนื่องจากต้องใช้เวลานานในการรอผลการทดลอง ต้องเพิ่มจำนวนซ้ำของการทดลองให้ได้อย่างน้อย 3 ซ้ำ

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ในงานวิจัยนี้มีการดูประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราจาก lipopeptide จากทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide เพียงวิธีเดียว ควรจะมีการทดสอบด้วยวิธีอื่นที่ง่ายและรวดเร็วเพิ่มเติมด้วย ได้แก่ วิธี dual culture เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. 2559. โรคแอนแทรคโนสกล้วยไม้ (Anthracnose) [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.ppsf.doae.go.th/pest_management/flower/anthracnose.html [30 มิถุนายน 2564]

ชนินทร ดวงสอาด, พรพิมล อธิปัญญาคม และ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. 2556. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของรา *Cladosporium* สาเหตุโรค. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร: 2001–2009.

ต้นกล้า อินสว่าง. 2551. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยใช้เทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2545. โรคของกล้วยไม้ที่เกิดมาจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทย [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://docs.google.com/document/d/1rRM-EQMHuWnTuyPQKCk156njIpare7vXM07EB4vKbLM/edit [30 มิถุนายน 2564]

ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล และ ศราวิชญ์ สายมงคล. 2558. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6. วารสารเกษตร 31(3): 301–310.

พรพิมล อธิปัญญาคม, สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด. 2555. การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร: 2319–2330.

วนิดา ชื่นชัน, ศิริพร พุ่มไสว, สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์ และ วรรณกร กิจจะ. 2562. การคัดเลือกและทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมฟิวซาเรียม โซลานาย. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยธนบุรี. 3(2): 43–54.

วีรวัฒน์ อัตตนาถ. 2551. โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) [online] แหล่งที่มา: https://www.bloggang.com/mainblog.php?id=pumorchids&month=28-08-2008&group=24&gblog=5 [21 กรกฎาคม 2564]

ศรีสุดา โท้ทอง. 2554. ศัตรูกล้วยไม้. วารสารเกษตรก้าวหน้า 24: 44–63.

ศรีสุดา โท้ทอง. 2558. โครงการวิจัยแก้ไขปัญหาการผลิตกล้วยไม้การค้าสกุลอื่นๆ. กรมวิชาการเกษตร.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร และ ทัศนาพร ทัศคร. 2550. การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคในกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้า. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557: 1–28.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร และ ทัศนาพร ทัศคร. 2556. การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคในกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้ารายงาน. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร: 2821–2828.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร และทัศนาพร ทัศคร. 2557. การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคในกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้า. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร: 294–302.

Axiom solution. 2555. โรคที่สำคัญและการป้องกันกำจัดสำหรับกล้วยไม้ [online]. แหล่งที่มา: http://oknation.nationtv.tv/blog/horti-asia/2012/12/19/entry-4 [21 กรกฎาคม 2564]

ภาษาอังกฤษ

Chen, Y., Liu, S.A., Mou, H., Ma, Y., Li, M. and Hu, X. 2017. Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* mb01 from marine sediments. Frontiers in Microbiology. 8: 1–11.

Choub, V., Maung, C., Won, S., Han, Y., Cho, J. and Ahn, Y. 2021. Antifungal activity of cyclic tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Pathogens. 10: 209.

Corda ACI. 1831. Die Pilze Deutschlands. In: Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen (Sturm J, ed.). Sturm, Nürnberg: vol. 3, Abt. 12: 33–64, tab. 21–32

Butler E. J. and Gams W. 1971. *Fusarium sacchari.*

Hazarika, J.D., Goswami, G., Gautom, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M. and Boro, C.R. 2019. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. BMC Microbiology. 19: 71–83.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing.

Li, T., Li, L., Du, F., Sun, L., Shi, J., Long, M. and Chen, Z. 2021. Activity and Mechanism of Action of Antifungal Peptides from Microorganisms: A Review. Molecules. 26: 2438.

Pretorius, D., Van Rooyen, J. and Clarke, K.G. 2015. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. New Biotechnology. 32: 243–252.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A. and Berkeley, C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov., nom. Rev. International Journal of Sytematic Bacteriology. 69–71.

Mongkolthanaruk, W. 2012. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, human and animals. Journal of Microbiology and Biotechnology. 22: 1597–1604.

Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P. D., Chukeatirote, E., Mckenzie, E. H. C., Bahkali, A. H., Dai, D. and Hyde, K. D. 2011. *Phyllosticta* an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity. 51 (1).

WoldemariamYohannes, K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y., Wang, J. and Sun, B. 2020. Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 68: 14709–14727.

Sacc., 1911. *Sclerotium rolfsii.* Annls mycol. 9(3): 257.

Schoch C. L., Shoemaker R. A., Seifert K. A., Hambleton S., Spatafora J. W. and Crous P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia. 98 (6): 1041–52.

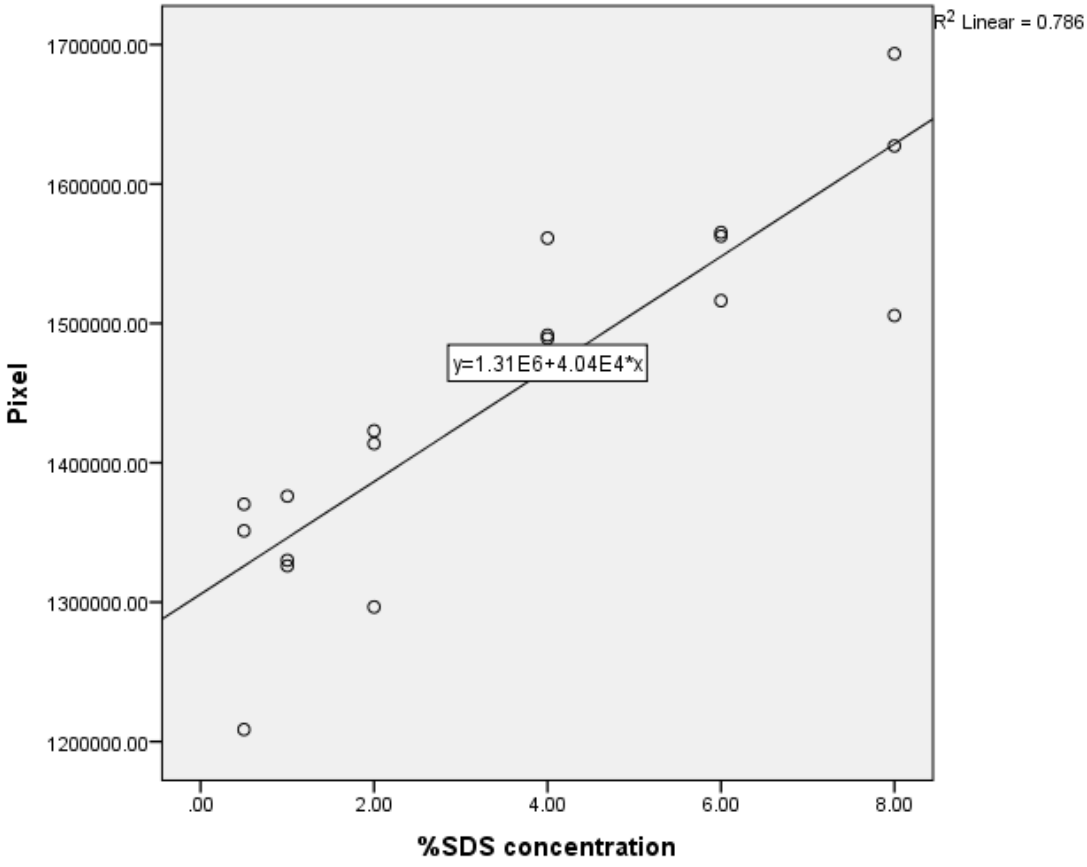
Sharma, G. and Shenoy, B.D. 2016. Colletotrichum systematics: past, present and prospects. Mycosphere. 7: 1093–1102.

Yamamoto, S., Shiraishi, S. and Suzuki., S. 2014. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? The Society for Applied Microbiology. 60: 379–386.

Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M.S.R., Yang, H. and Jin, M. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus.* Applied Microbiology and Biotechnology. 101: 5951–5960.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างขนาดหยดและความเข้มข้นของ Sodium dodecyl sulfate (SDS)



ภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลการแสดงผลการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ในเชื้อรา 5 ชนิด ทดสอบโดยวิธี Shapiro-Wilk test

	percent of lipopeptide	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
%inhibition of *Fusarium sacchari*	10	.380	3	.	.763	3	.029
	30	.239	3	.	.975	3	.698
	50	.207	3	.	.992	3	.834
%inhibition of *Sclerotium* sp.	10	.376	3	.	.773	3	.052
	30	.270	3	.	.949	3	.564
	50	.332	3	.	.864	3	.278
%inhibition of *Cladosporium* sp.	10	.235	3	.	.978	3	.715
	30	.243	3	.	.973	3	.682
	50	.190	3	.	.997	3	.904
%inhibition of *Collectotrichum* sp.	10	.378	3	.	.766	3	.036
	30	.365	3	.	.798	3	.110
	50	.330	3	.	.867	3	.287
%inhibition of *Phyllosticta* sp.	10	.180	3	.	.999	3	.944
	30	.208	3	.	.992	3	.827
	50	.200	3	.	.995	3	.861

a. Lilliefors Significance Correction

ภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลการแสดงความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Fusarium sacchari* ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Day1_1 is the same across categories of Concentration_1.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.284	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Day3_1 is the same across categories of Concentration_1.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.225	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Day7_1 is the same across categories of Concentration_1.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.202	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Day14_1 is the same across categories of Concentration_1.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.	Unable to compute.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

ภาคผนวกที่ 4 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Sclerotium* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Day1_2 is the same across categories of Concentration_2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.170	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Day3_2 is the same across categories of Concentration_2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.158	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Day7_2 is the same across categories of Concentration_2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.149	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Day14_2 is the same across categories of Concentration_2.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.	Unable to compute.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

ภาคผนวกที่ 5 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Collectotrichum* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Day1_3 is the same across categories of Concentraton_3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.277	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Day3_3 is the same across categories of Concentraton_3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.238	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Day7_3 is the same across categories of Concentraton_3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.202	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Day14_3 is the same across categories of Concentraton_3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.	Unable to compute.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

ภาคผนวกที่ 6 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Phyllosticta* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Day1_4 is the same across categories of Concentration_4.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.194	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Day3_4 is the same across categories of Concentration_4.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.189	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Day7_4 is the same across categories of Concentration_4.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.280	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Day14_4 is the same across categories of Concentration_4.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.423	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

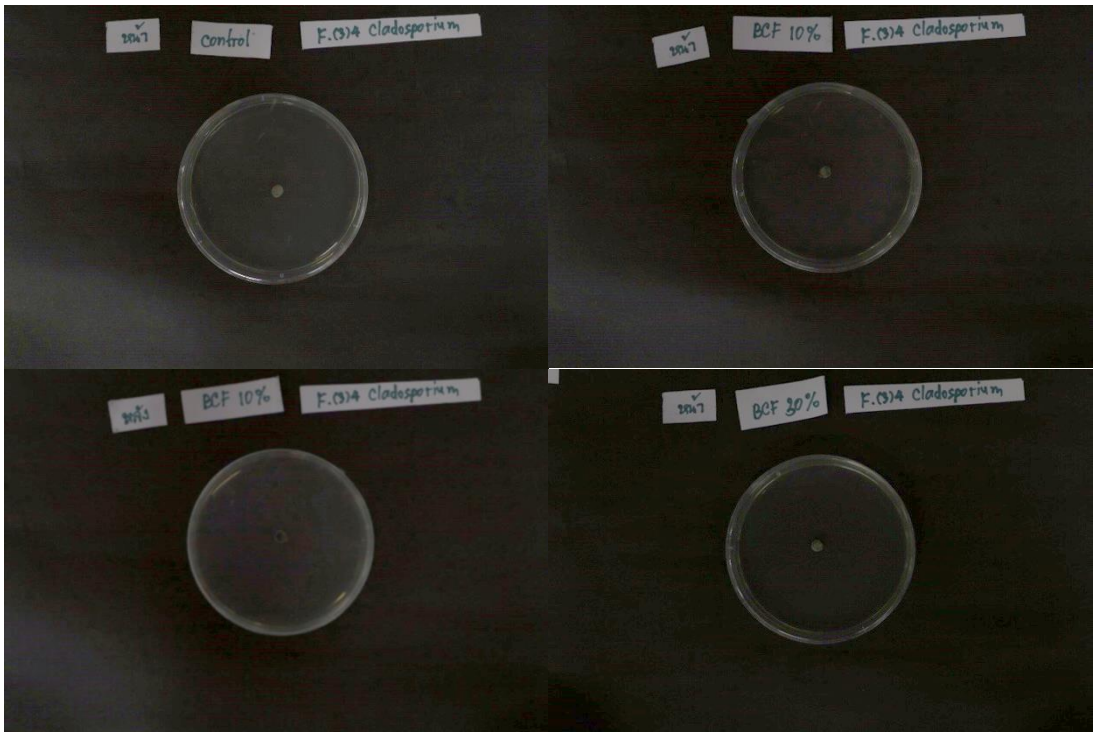
ภาคผนวกที่ 7 ข้อมูลการแสดงผลความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละความเข้มข้นของ lipopeptide ใน *Cladosporium* sp. ทดสอบโดยวิธี Kruskal-Wallis test

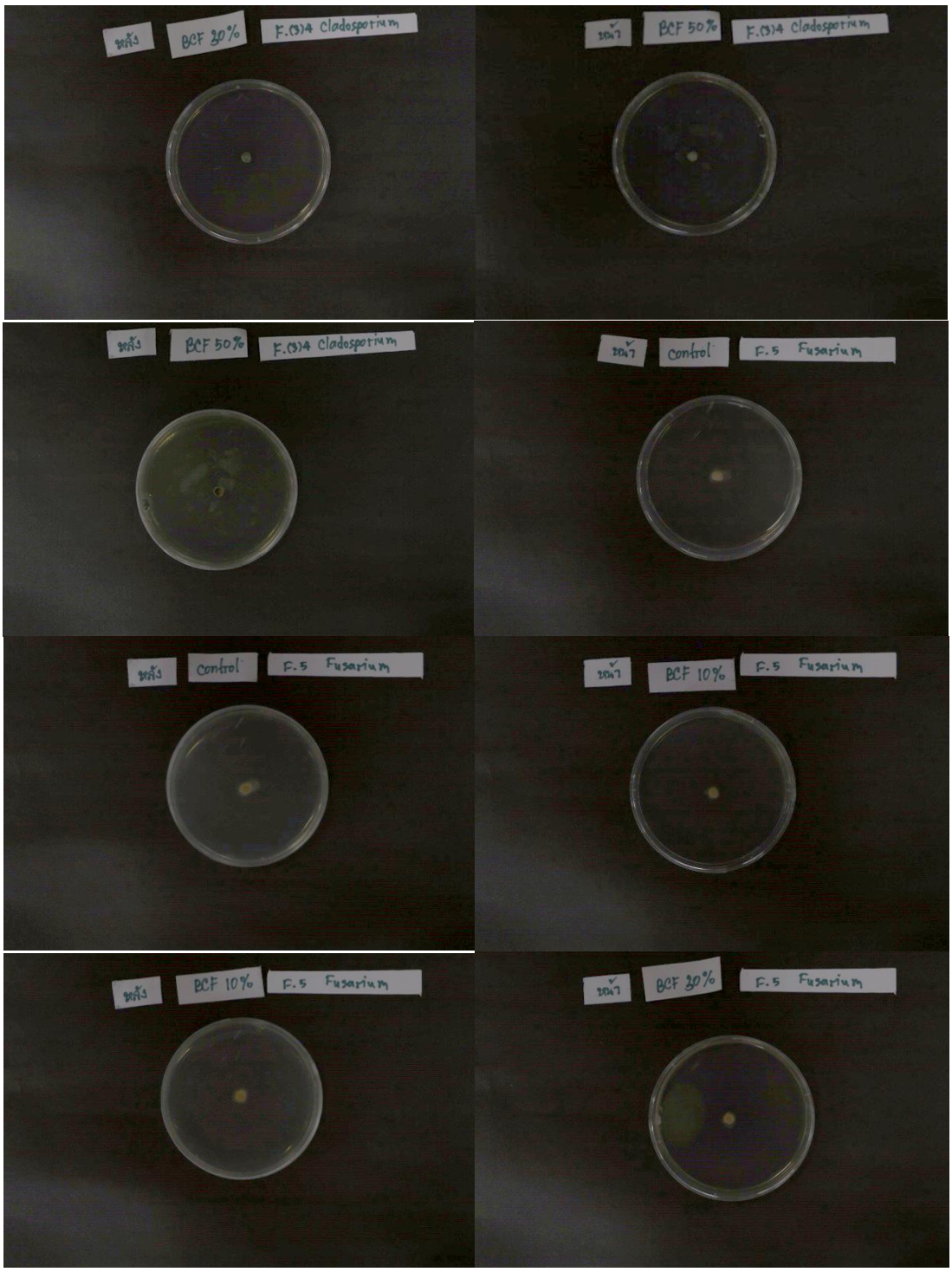
Hypothesis Test Summary

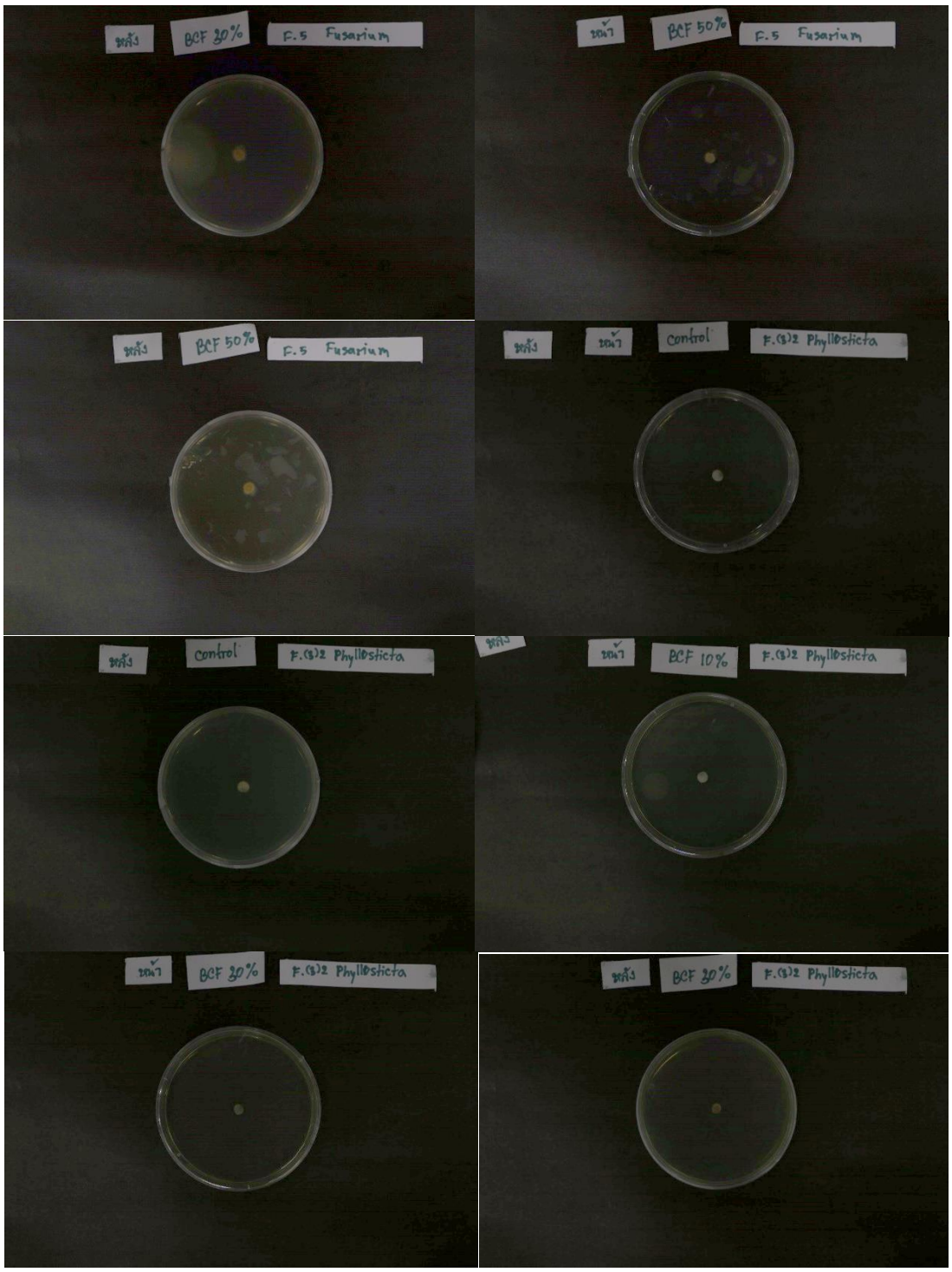
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Day1_5 is the same across categories of Concentration_5.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.143	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Day3_5 is the same across categories of Concentration_5.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.155	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Day7_5 is the same across categories of Concentration_5.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.215	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Day14_5 is the same across categories of Concentration_5.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.368	Retain the null hypothesis.

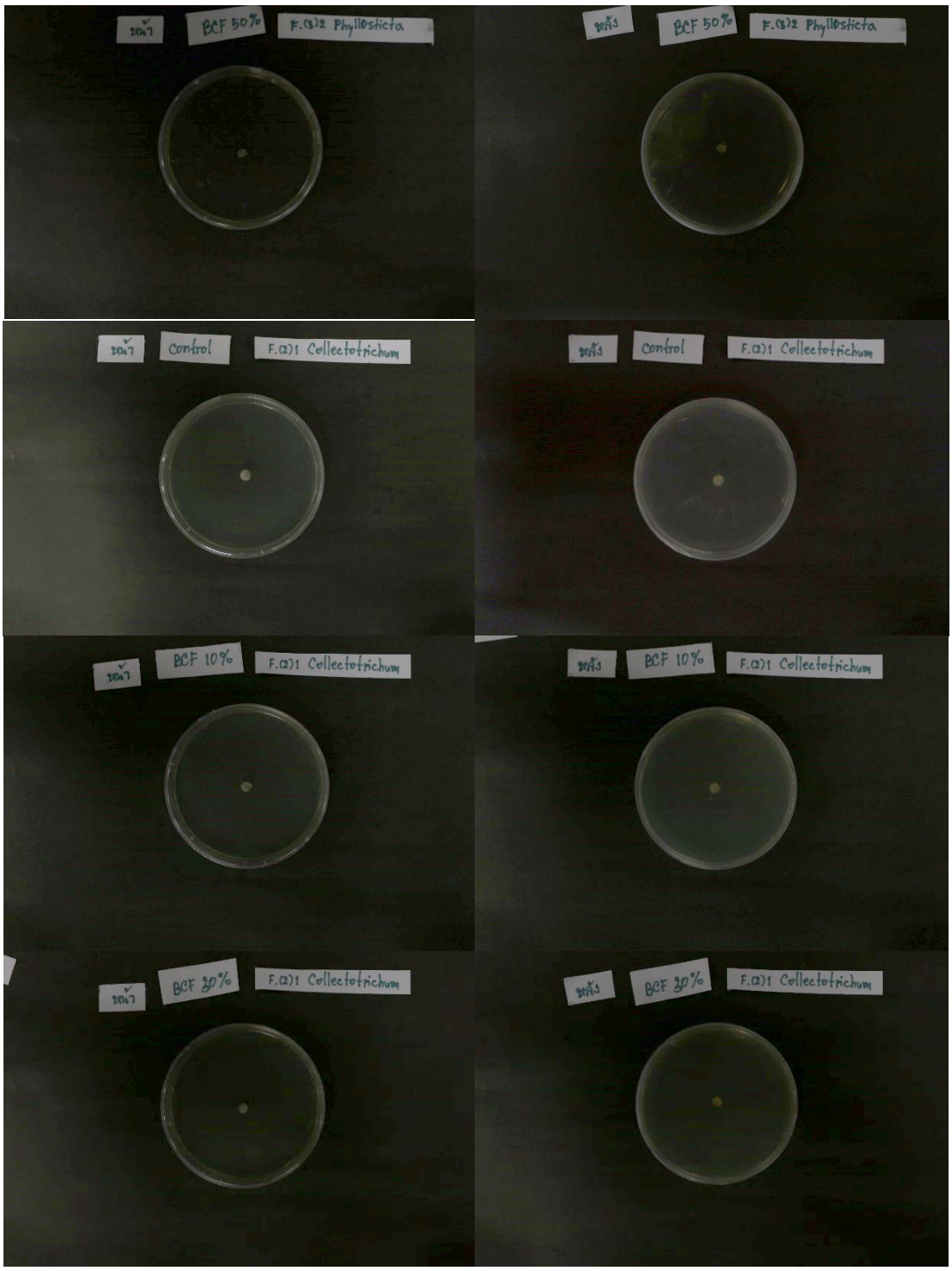
Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

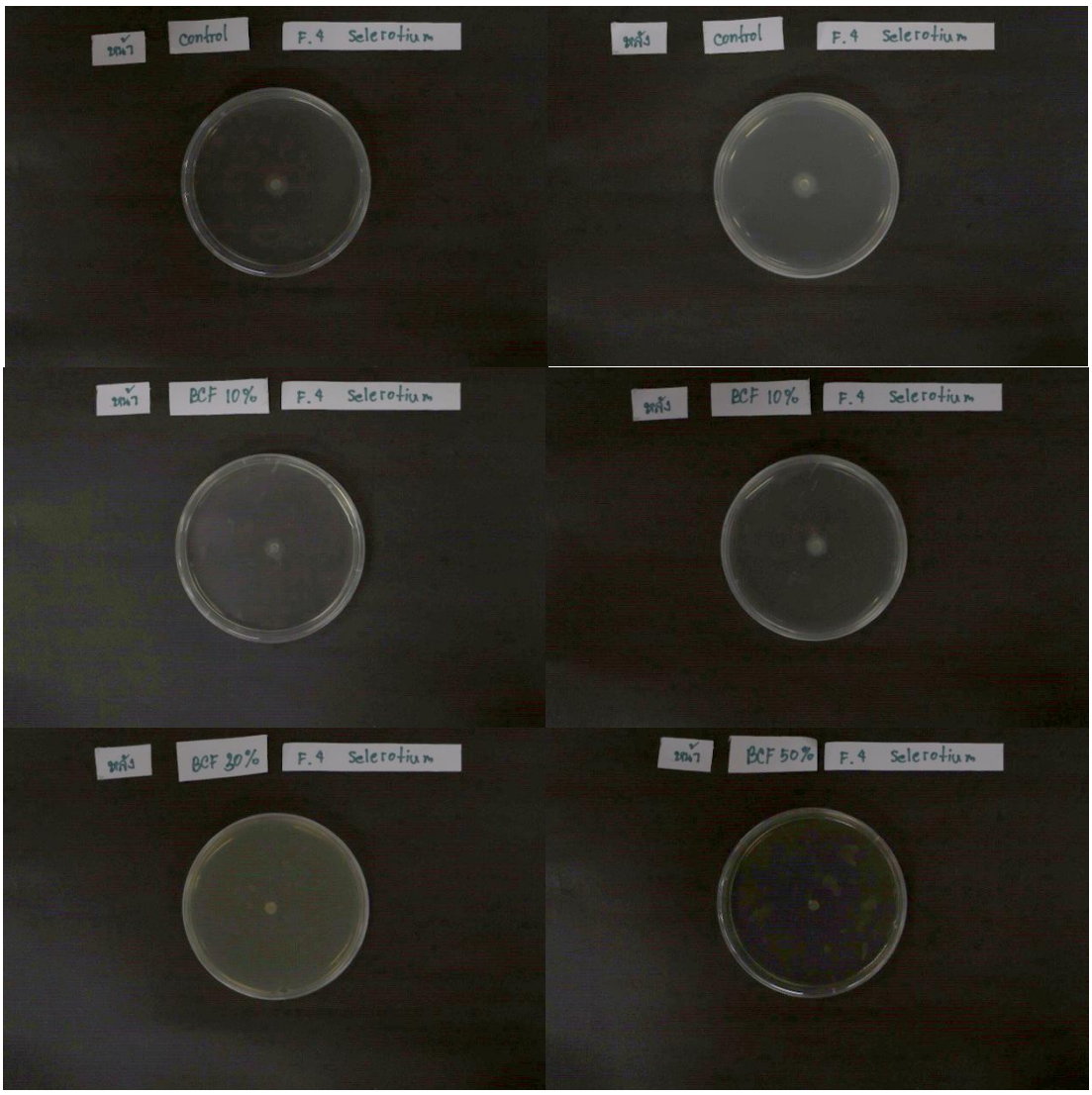
ภาคผนวกที่ 8 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 1 วัน



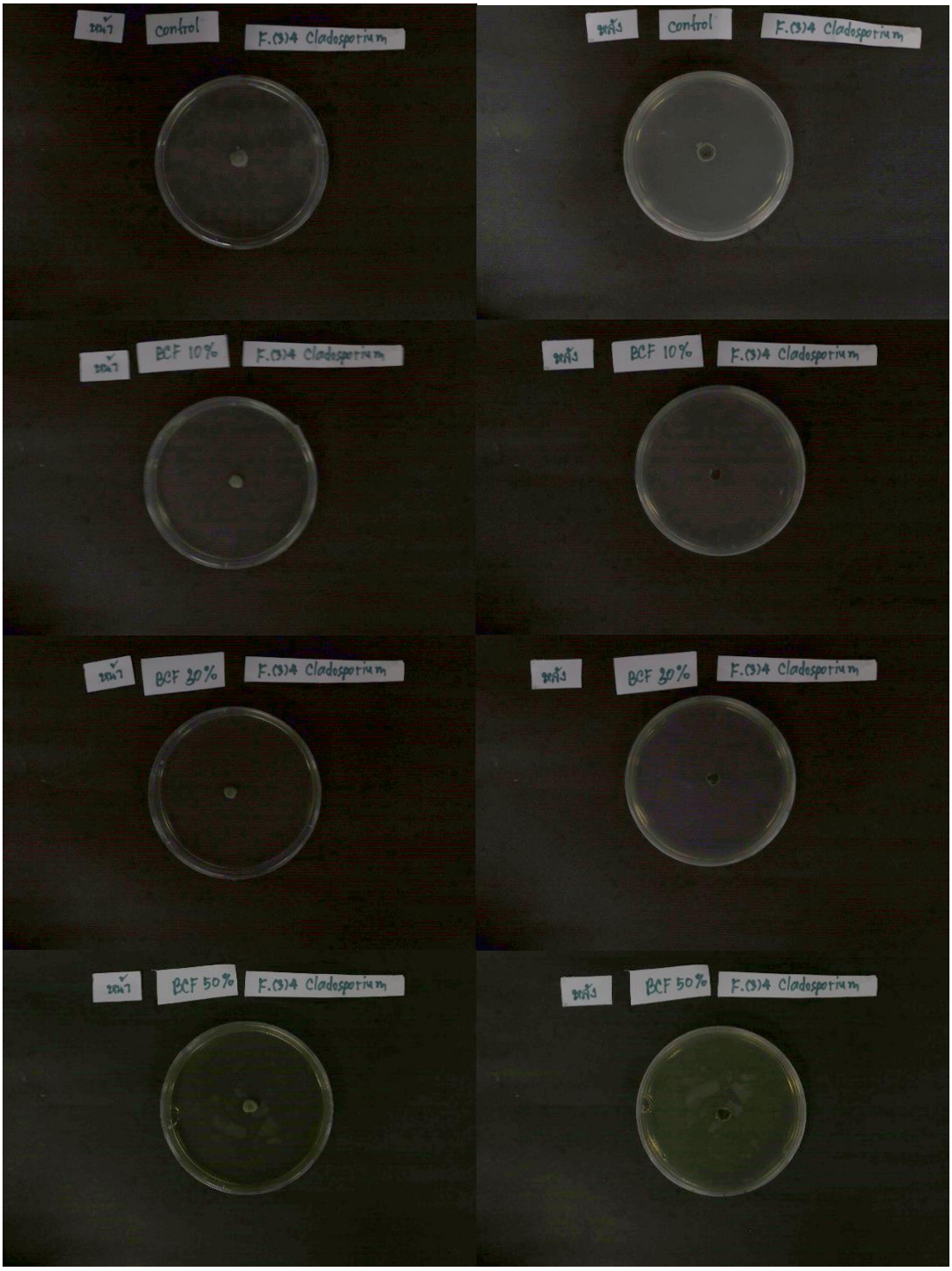

หลัง BCF 30% F.(3)4 Cladosporium
หน้า BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
หลัง BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
หน้า control F.5 Fusarium
หลัง control F.5 Fusarium
หน้า BCF 10% F.5 Fusarium
หลัง BCF 10% F.5 Fusarium
หน้า BCF 30% F.5 Fusarium

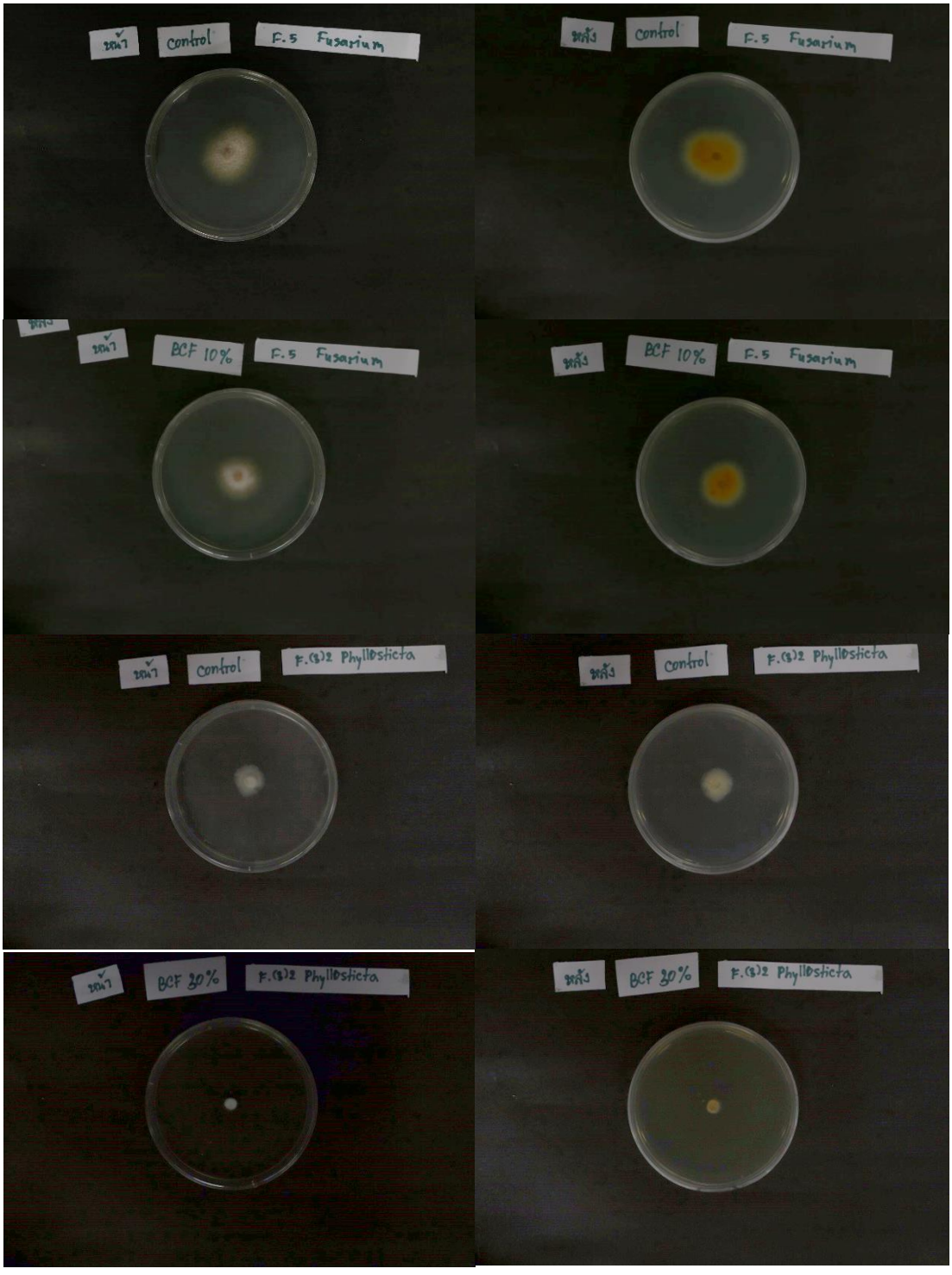

หลัง
BCF 30%
F.5 Fusarium
หน้า
BCF 50%
F.5 Fusarium
หลัง
BCF 50%
F.5 Fusarium
หลัง
หน้า
Control
F.(3)2 Phyllosticta
หลัง
Control
F.(3)2 Phyllosticta
หน้า
BCF 10%
F.(3)2 Phyllosticta
หน้า
BCF 30%
F.(3)2 Phyllosticta
หลัง
BCF 30%
F.(3)2 Phyllosticta

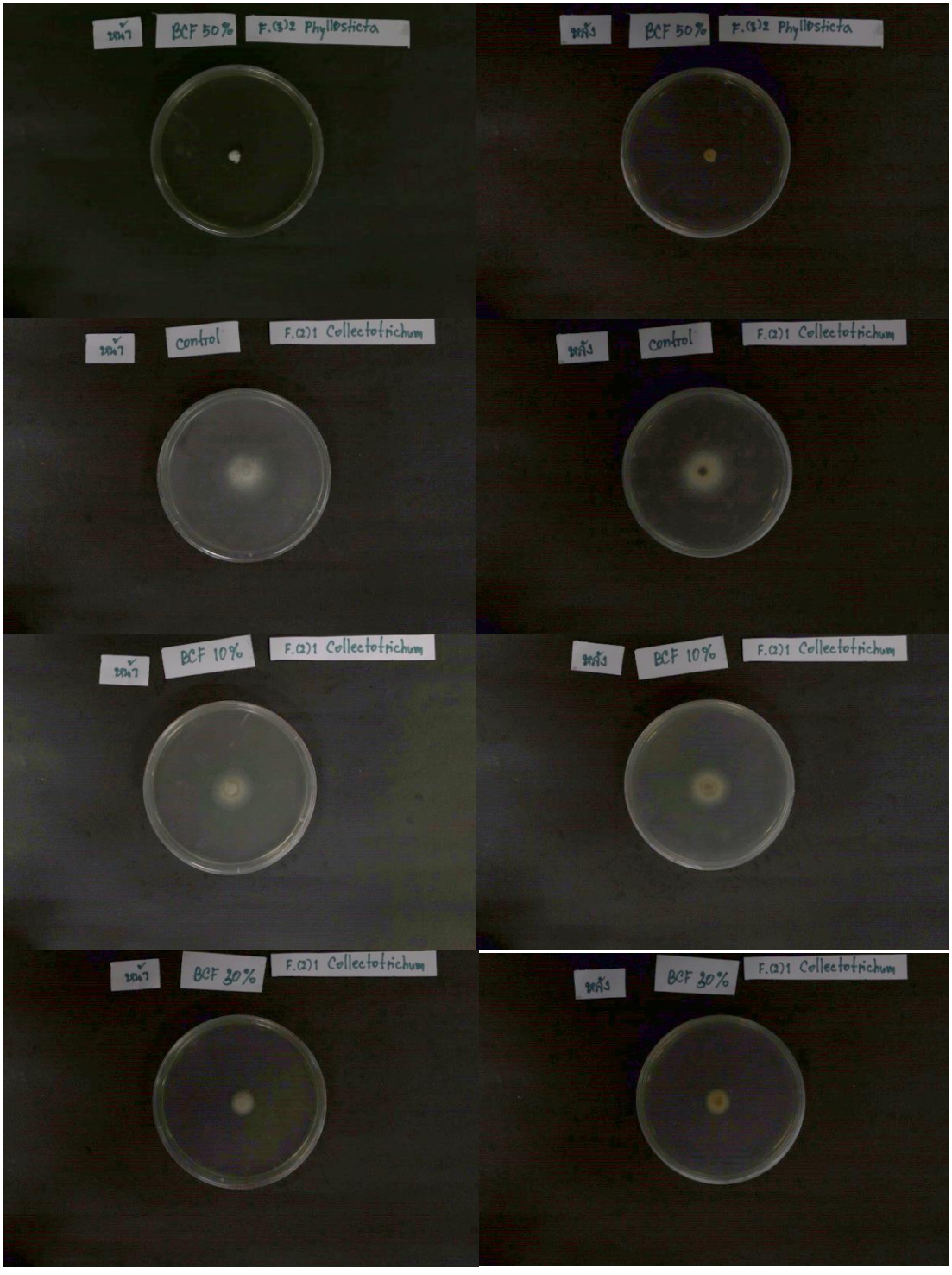

หน้า
BCF 50%
F.(3)2 Phyllosticta
หลัง
BCF 50%
F.(3)2 Phyllosticta
หน้า
Control
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
Control
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 30%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 30%
F.(2)1 Colleetotrichum

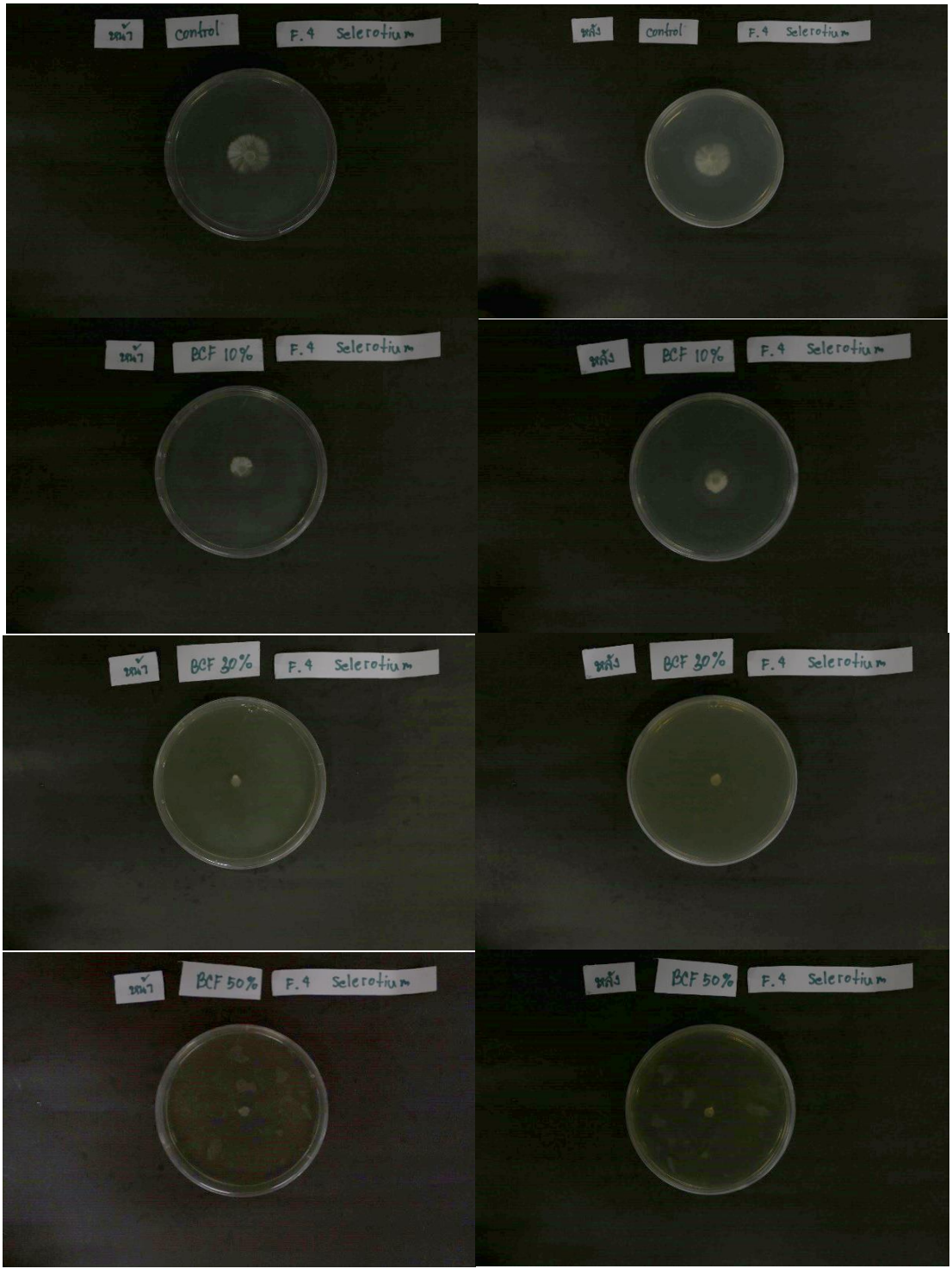

หน้า
Control
F.4 Selerotium
หลัง
Control
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 10%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 10%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 30%
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 50%
F.4 Selerotium

ภาคผนวกที่ 9 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 3 วัน

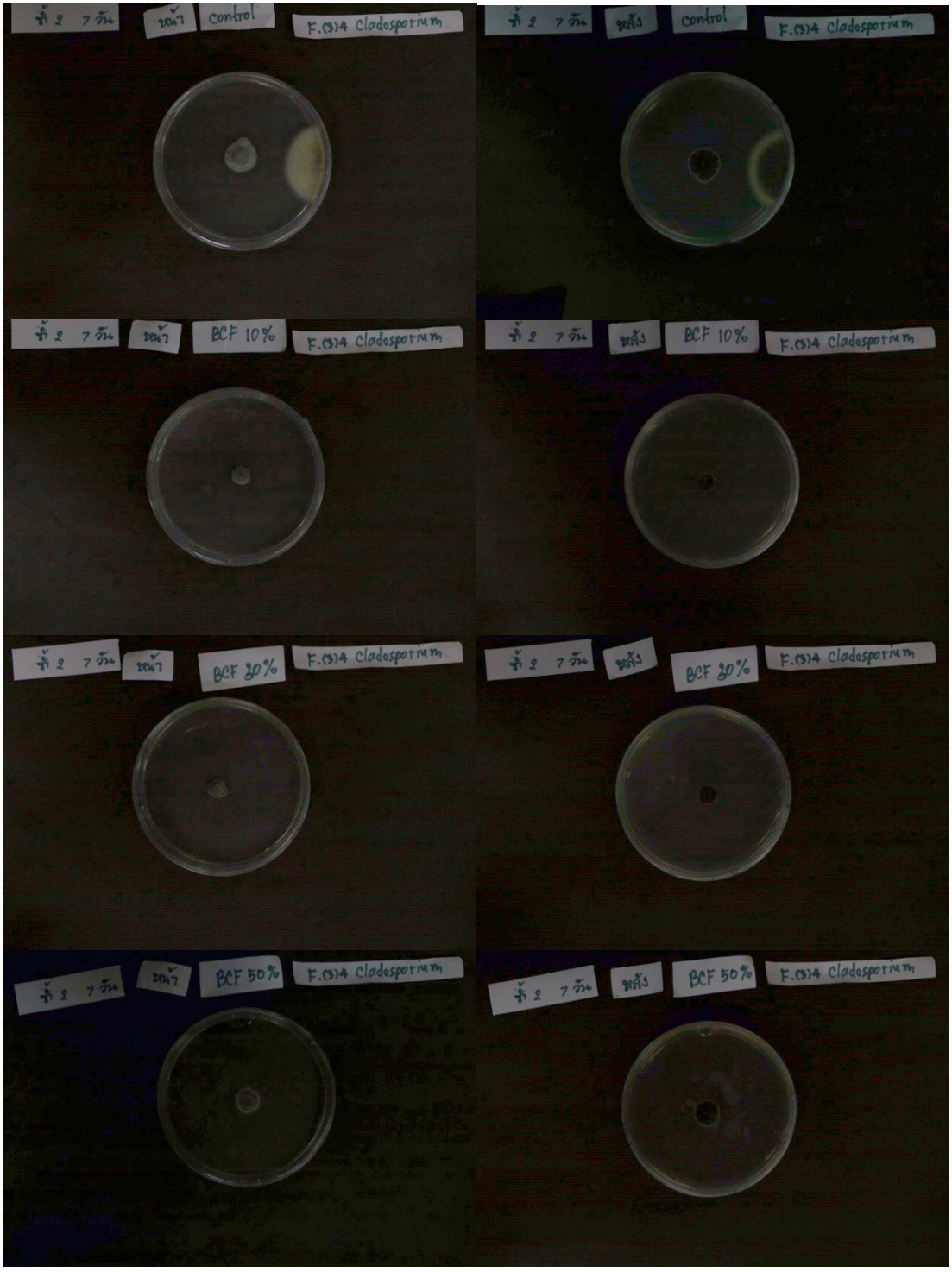


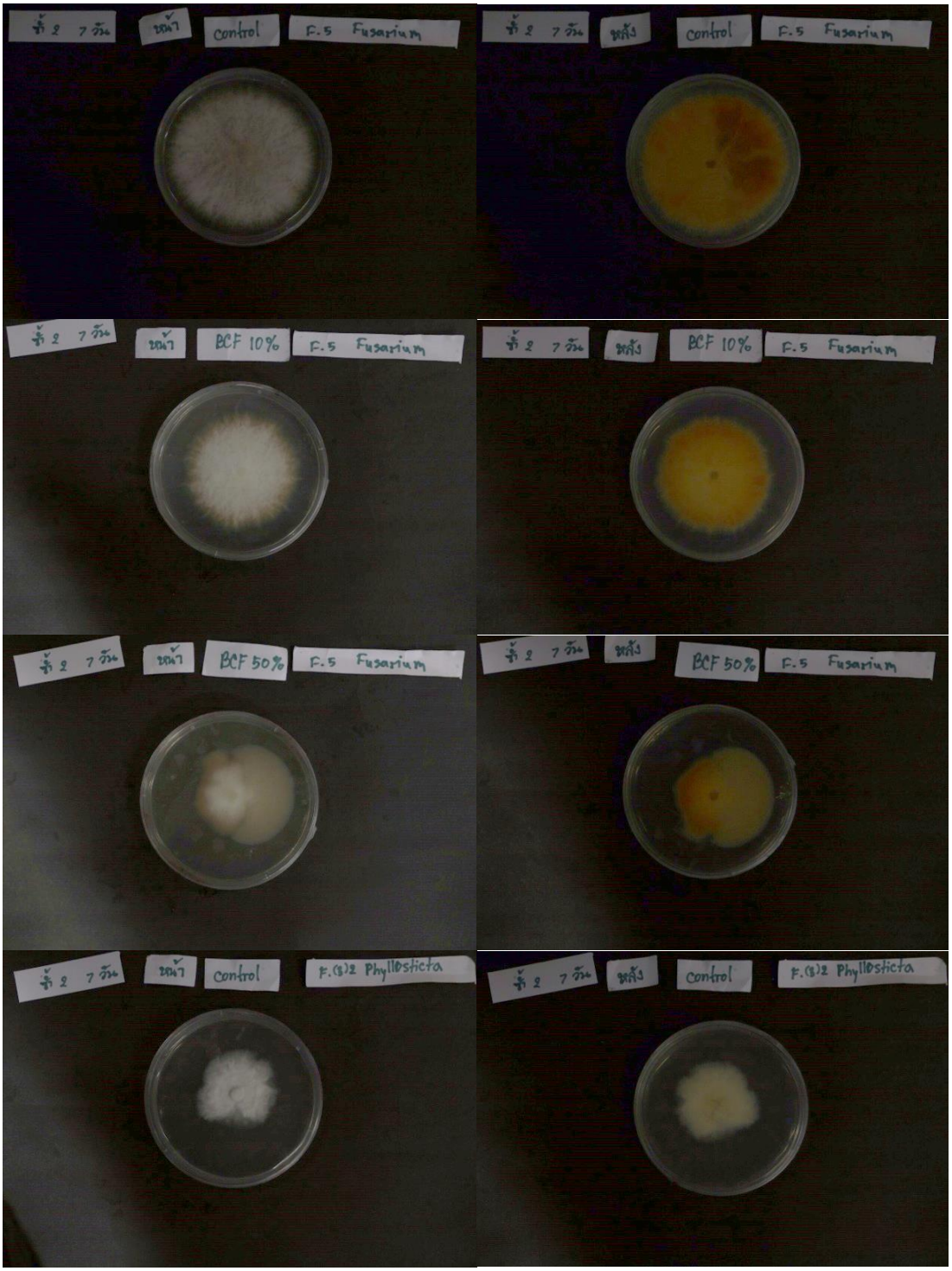

หน้า control F.5 Fusarium
หลัง control F.5 Fusarium
หน้า BCF 10% F.5 Fusarium
หลัง BCF 10% F.5 Fusarium
หน้า control F.(S)2 Phyllosticta
หลัง control F.(S)2 Phyllosticta
หน้า BCF 30% F.(S)2 Phyllosticta
หลัง BCF 30% F.(S)2 Phyllosticta

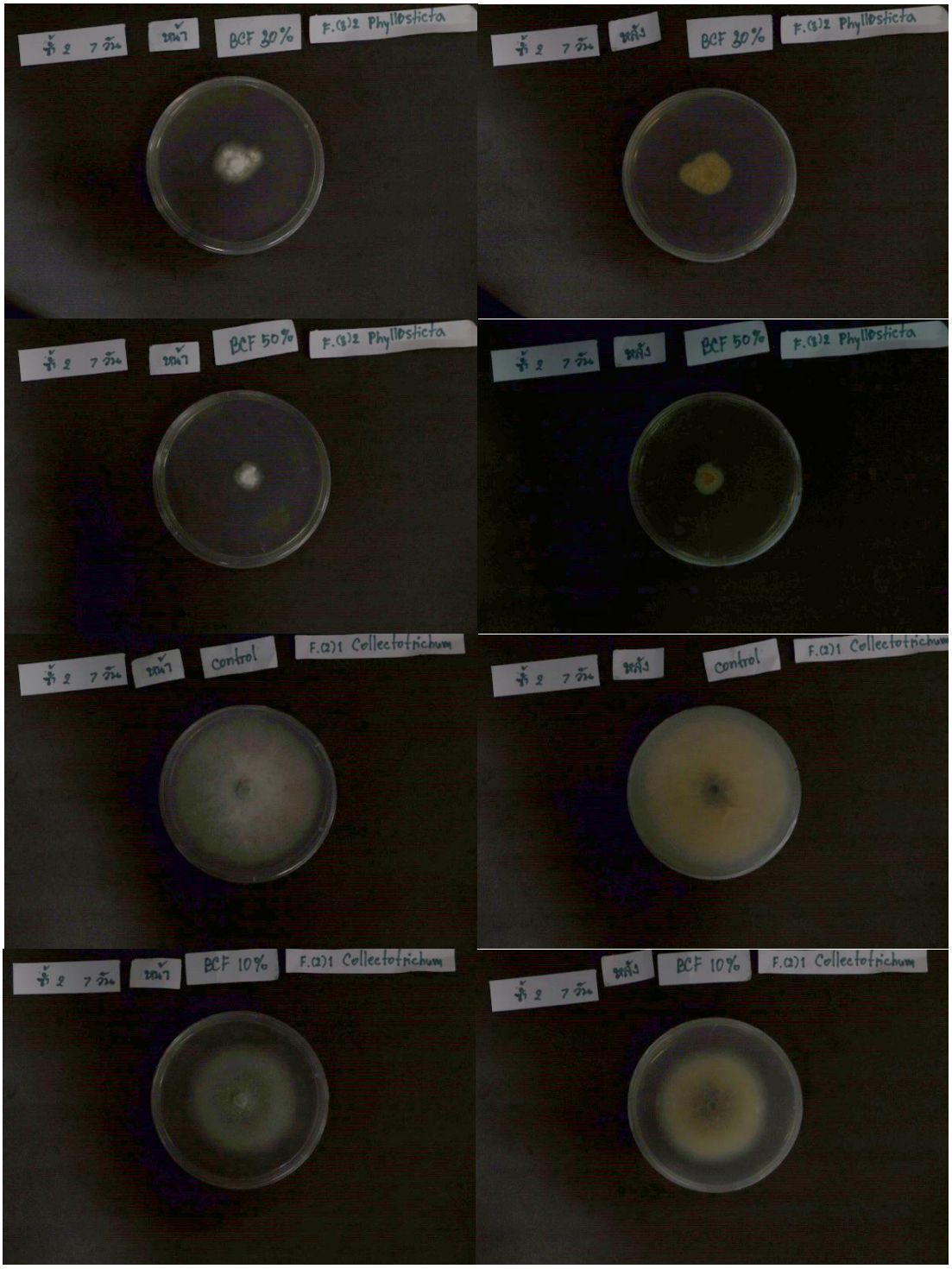

หน้า
BCF 50%
F.(ใ)2 Phyllosticta
หลัง
BCF 50%
F.(ใ)2 Phyllosticta
หน้า
control
F.(ใ)1 Collectotrichum
หลัง
control
F.(ใ)1 Collectotrichum
หน้า
BCF 10%
F.(ใ)1 Collectotrichum
หลัง
BCF 10%
F.(ใ)1 Collectotrichum
หน้า
BCF 30%
F.(ใ)1 Collectotrichum
หลัง
BCF 30%
F.(ใ)1 Collectotrichum

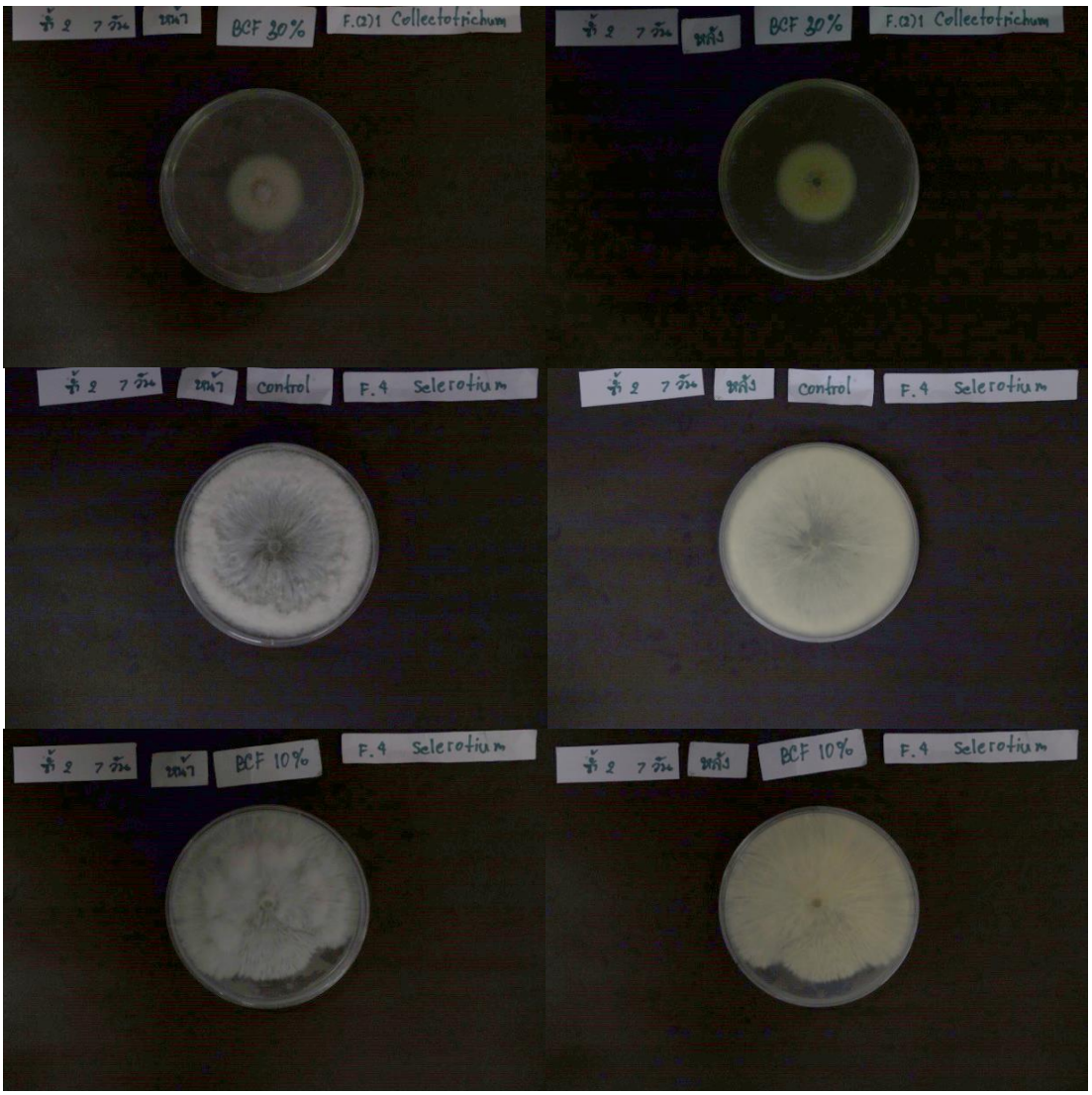

หน้า
control
F.4 Selerotium
หลัง
control
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 10%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 10%
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 30%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 30%
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 50%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 50%
F.4 Selerotium

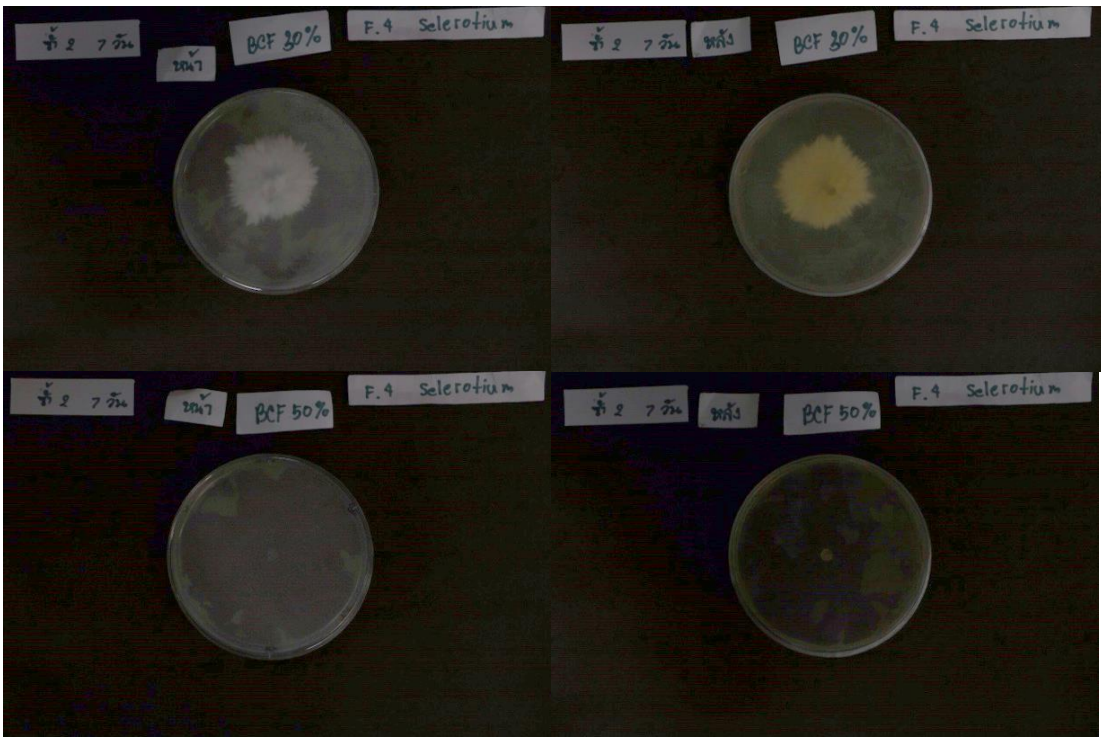
ภาคผนวกที่ 10 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 7 วัน



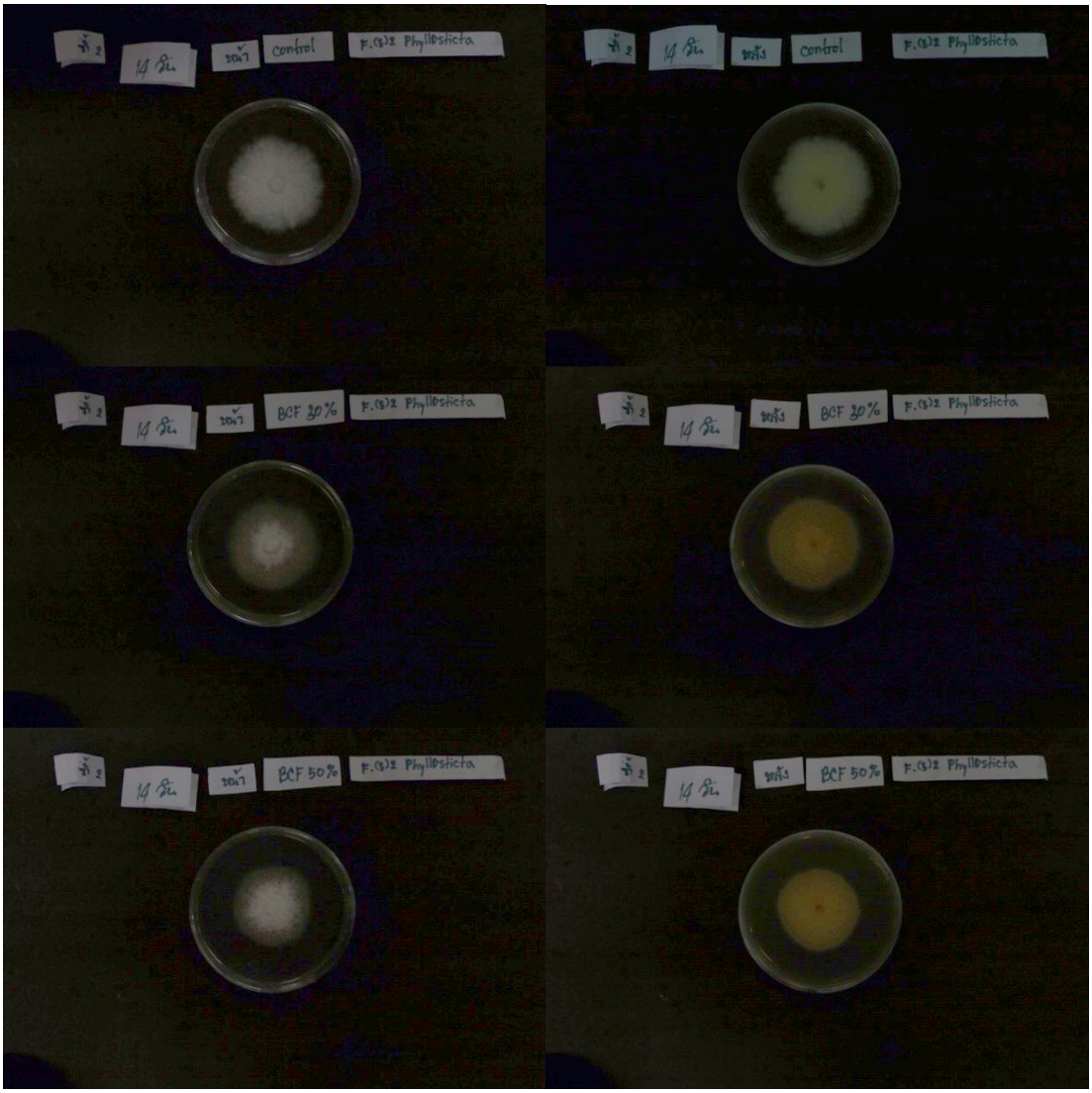

ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
control
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
control
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 10%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 10%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 50%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 50%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
control
F.(S)2 Phyllosticta
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
control
F.(S)2 Phyllosticta


ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 30%
F.(3)2 Phyllosticta
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 30%
F.(3)2 Phyllosticta
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 50%
F.(3)2 Phyllosticta
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 50%
F.(3)2 Phyllosticta
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
control
F.(2)1 Collectotrichum
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
control
F.(2)1 Collectotrichum
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 10%
F.(2)1 Collectotrichum
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 10%
F.(2)1 Collectotrichum

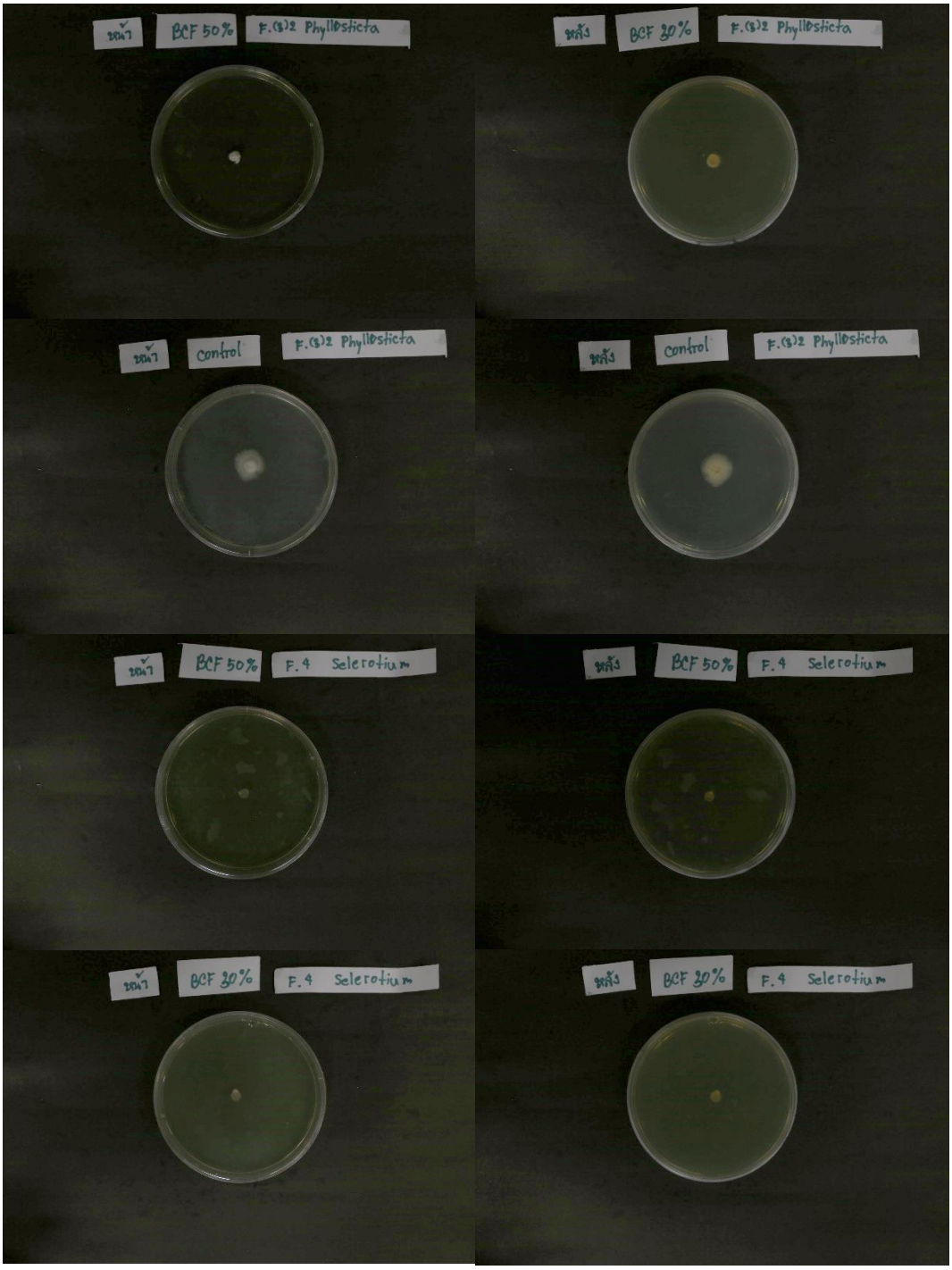

ชั้น 2 7 วัน หน้า BCF 30% F.(2)1 Collectotrichum
ชั้น 2 7 วัน หลัง BCF 30% F.(2)1 Collectotrichum
ชั้น 2 7 วัน หน้า control F.4 Selerotium
ชั้น 2 7 วัน หลัง control F.4 Selerotium
ชั้น 2 7 วัน หน้า BCF 10% F.4 Selerotium
ชั้น 2 7 วัน หลัง BCF 10% F.4 Selerotium

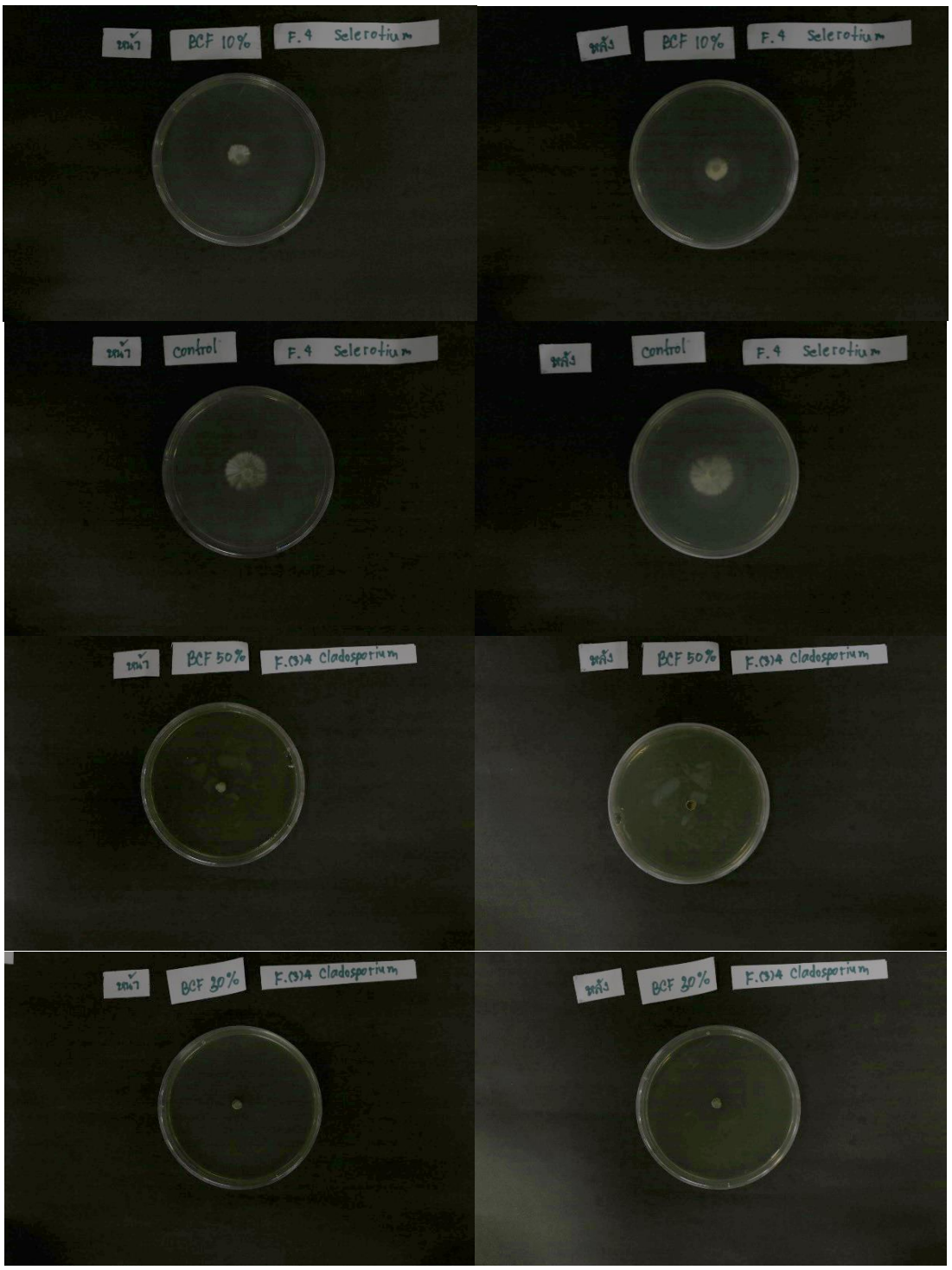

ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 30%
F.4 Sclerotium
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 30%
F.4 Sclerotium
ซ้ำ 2 7 วัน
หน้า
BCF 50%
F.4 Sclerotium
ซ้ำ 2 7 วัน
หลัง
BCF 50%
F.4 Sclerotium

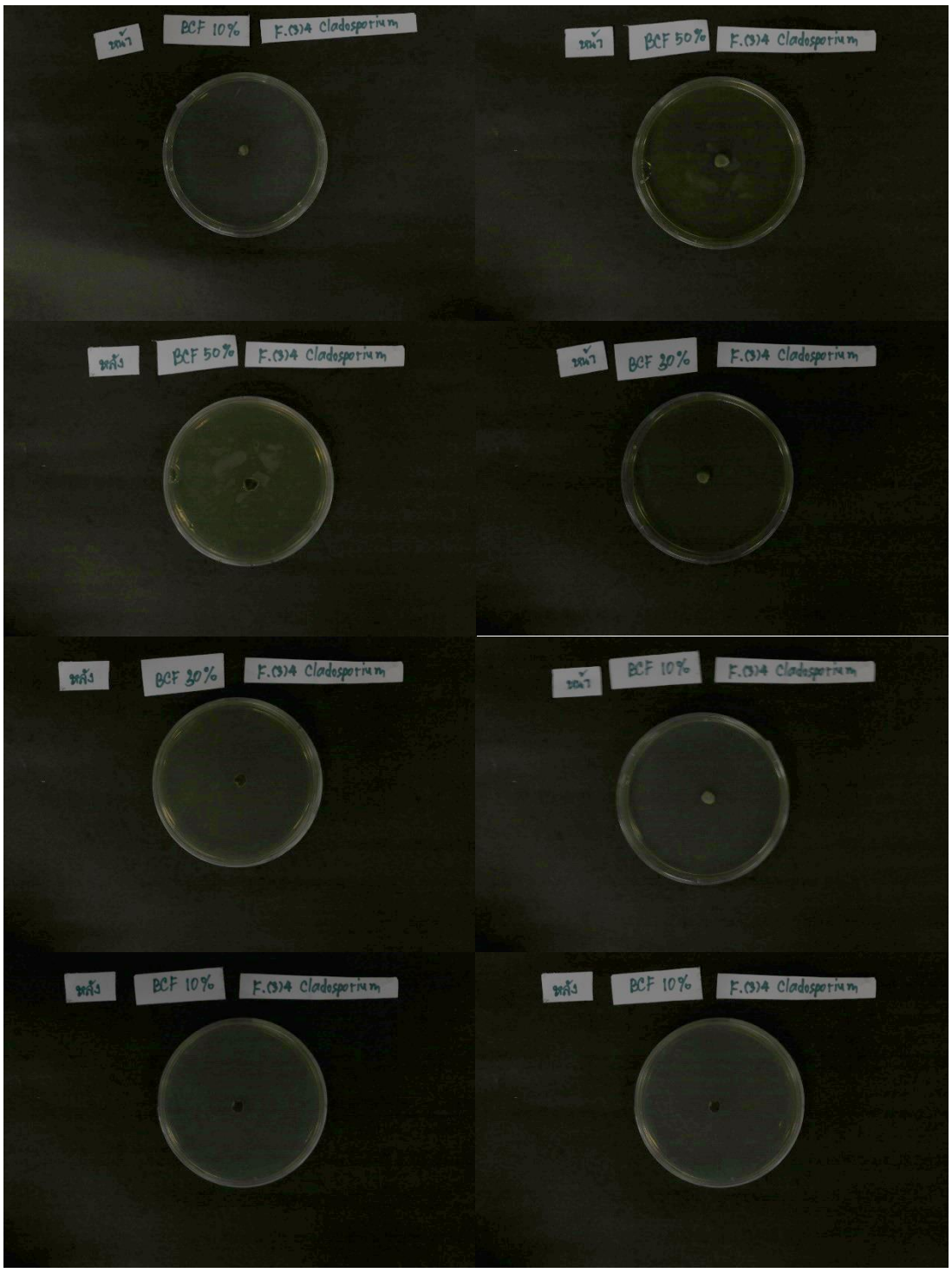
ภาคผนวกที่ 11 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง *phyllosticta* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมlipopeptide ชุดการทดลองที่ 1 ระยะเวลา 14 วัน

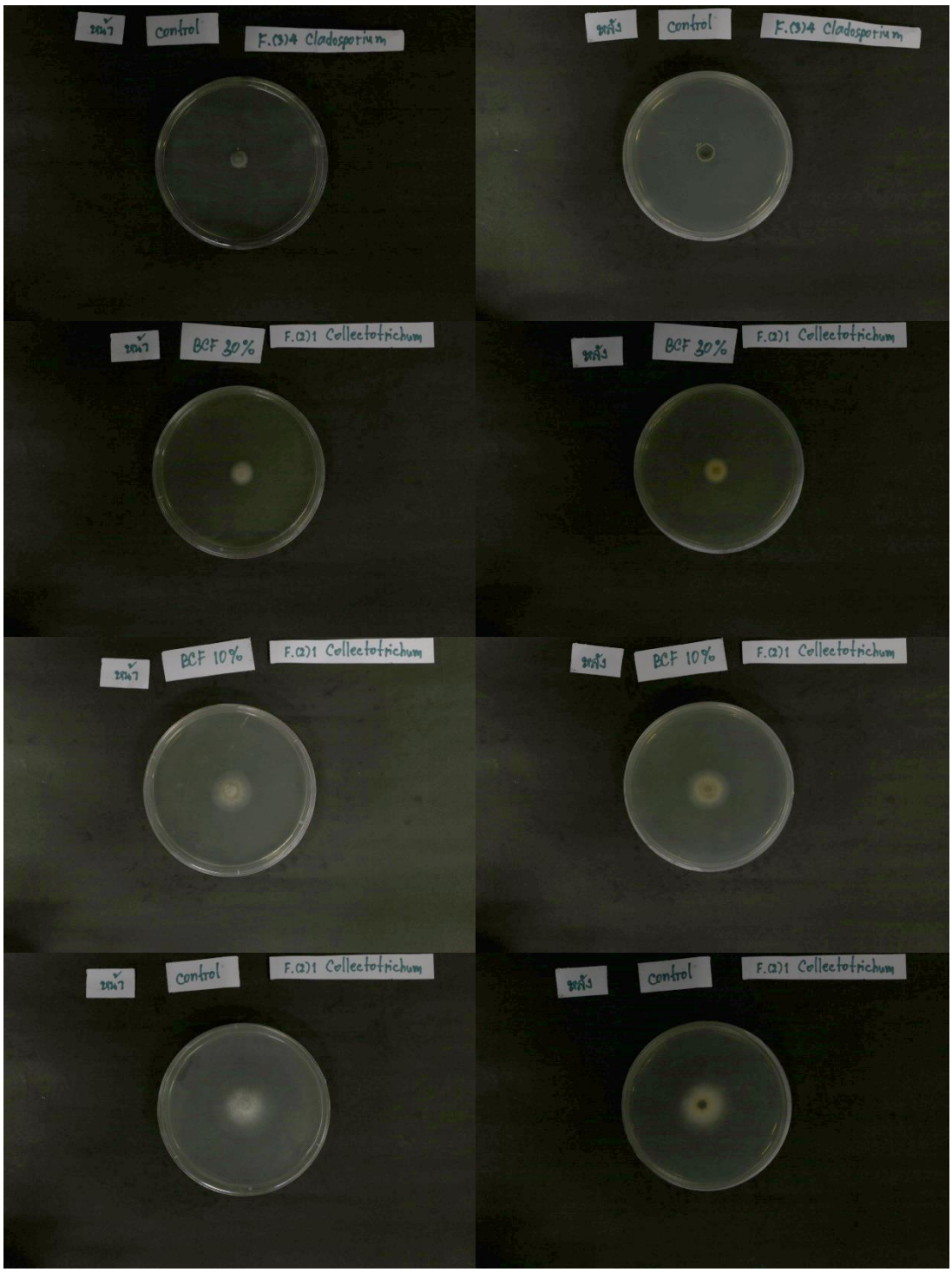


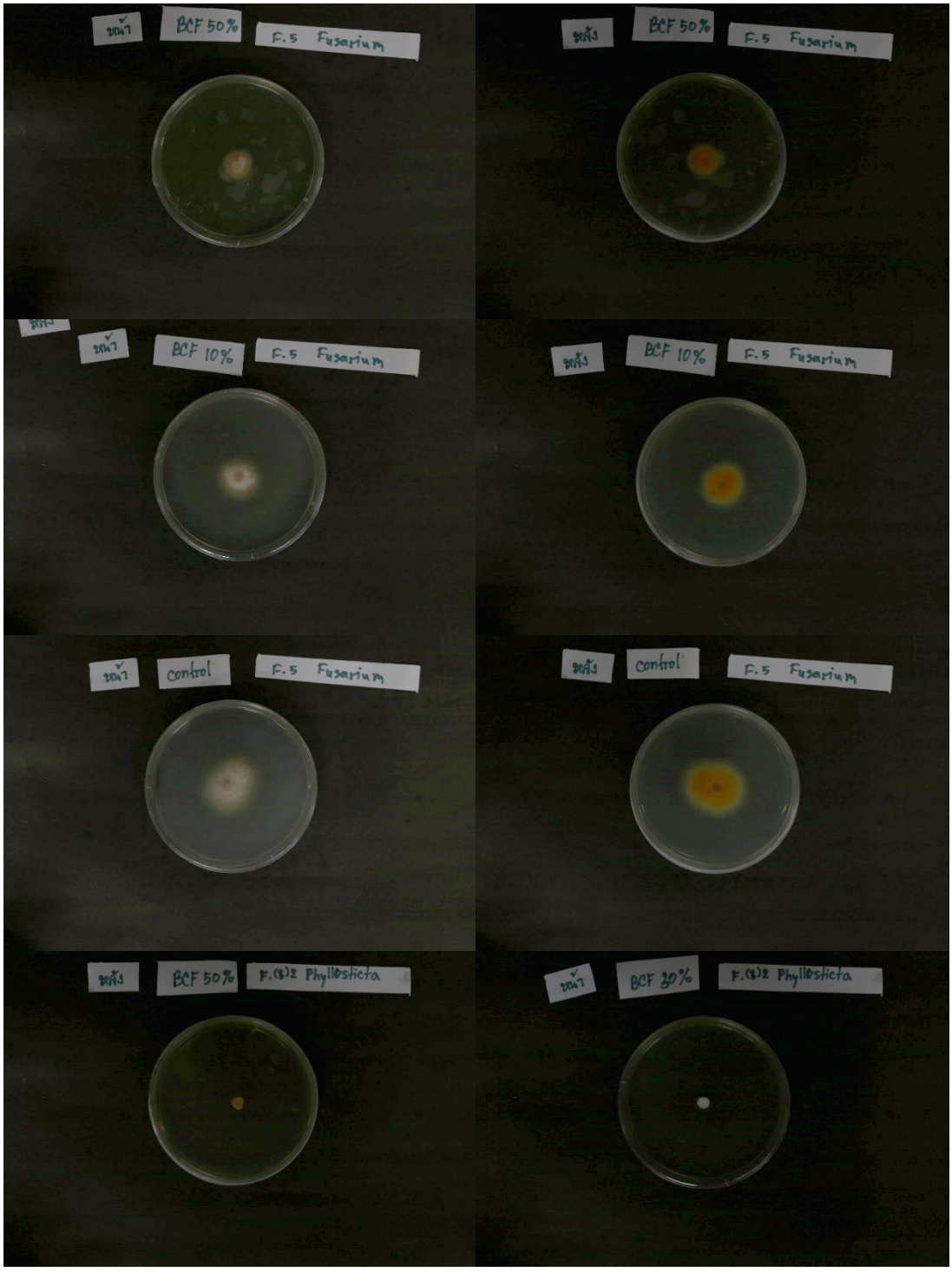
ภาคผนวกที่ 12 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 1 วัน



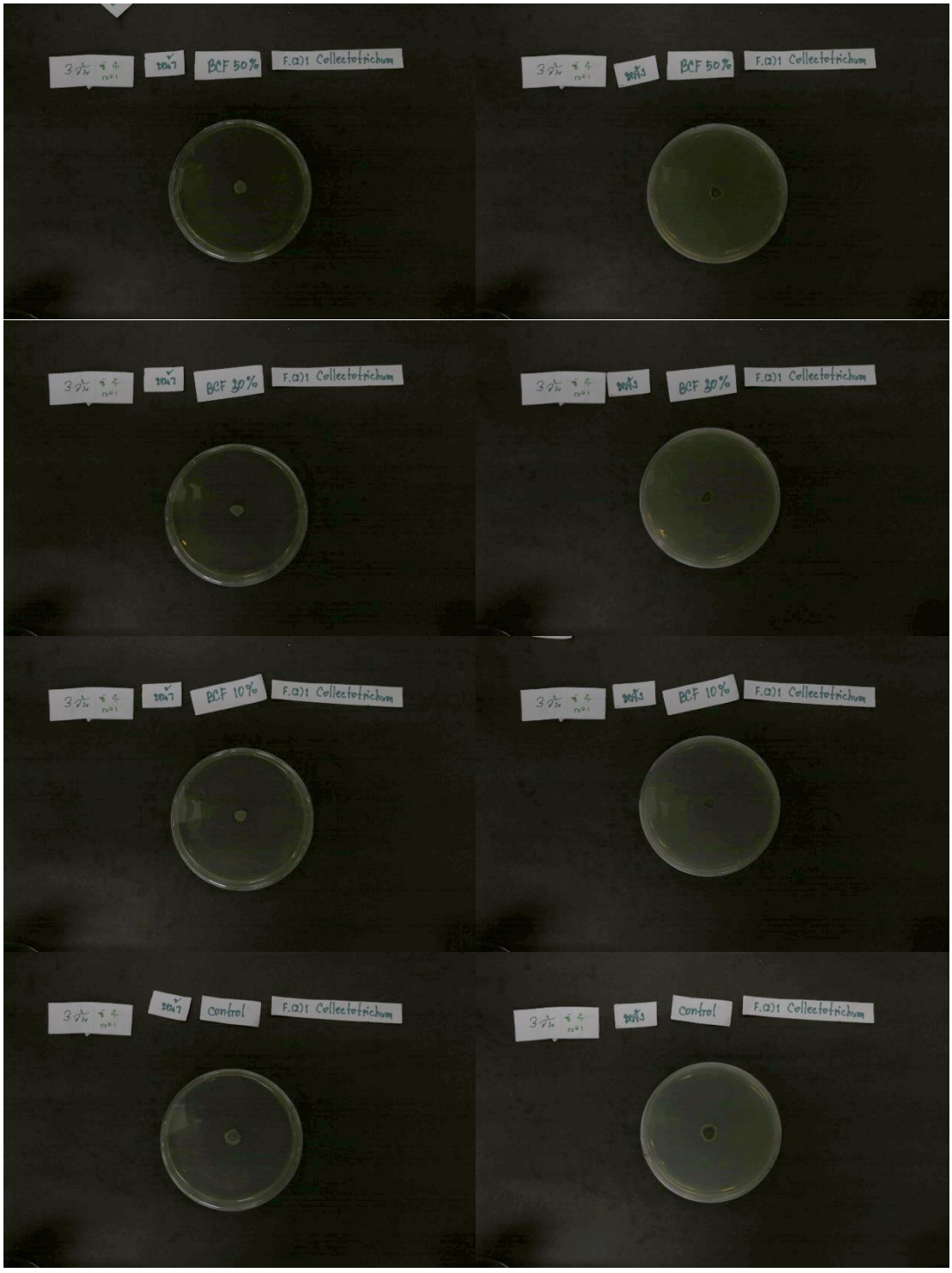

หน้า
BCF 10%
F.4 Selerotium
หลัง
BCF 10%
F.4 Selerotium
หน้า
control
F.4 Selerotium
หลัง
control
F.4 Selerotium
หน้า
BCF 50%
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
BCF 50%
F.(3)4 Cladosporium
หน้า
BCF 30%
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
BCF 30%
F.(3)4 Cladosporium

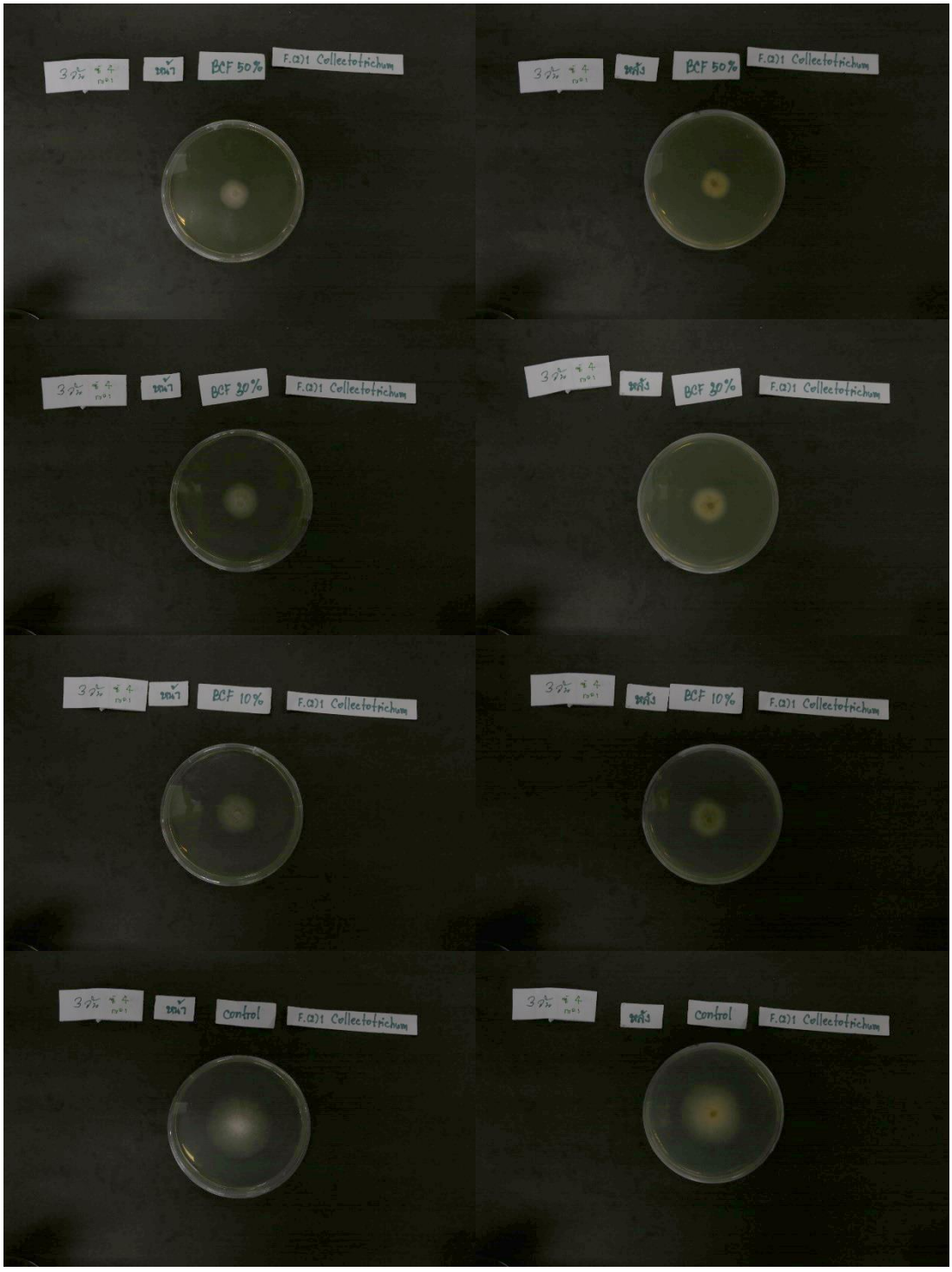

หน้า BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
หน้า BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
หลัง BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
หน้า BCF 30% F.(3)4 Cladosporium
หลัง BCF 30% F.(3)4 Cladosporium
หน้า BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
หลัง BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
หลัง BCF 10% F.(3)4 Cladosporium

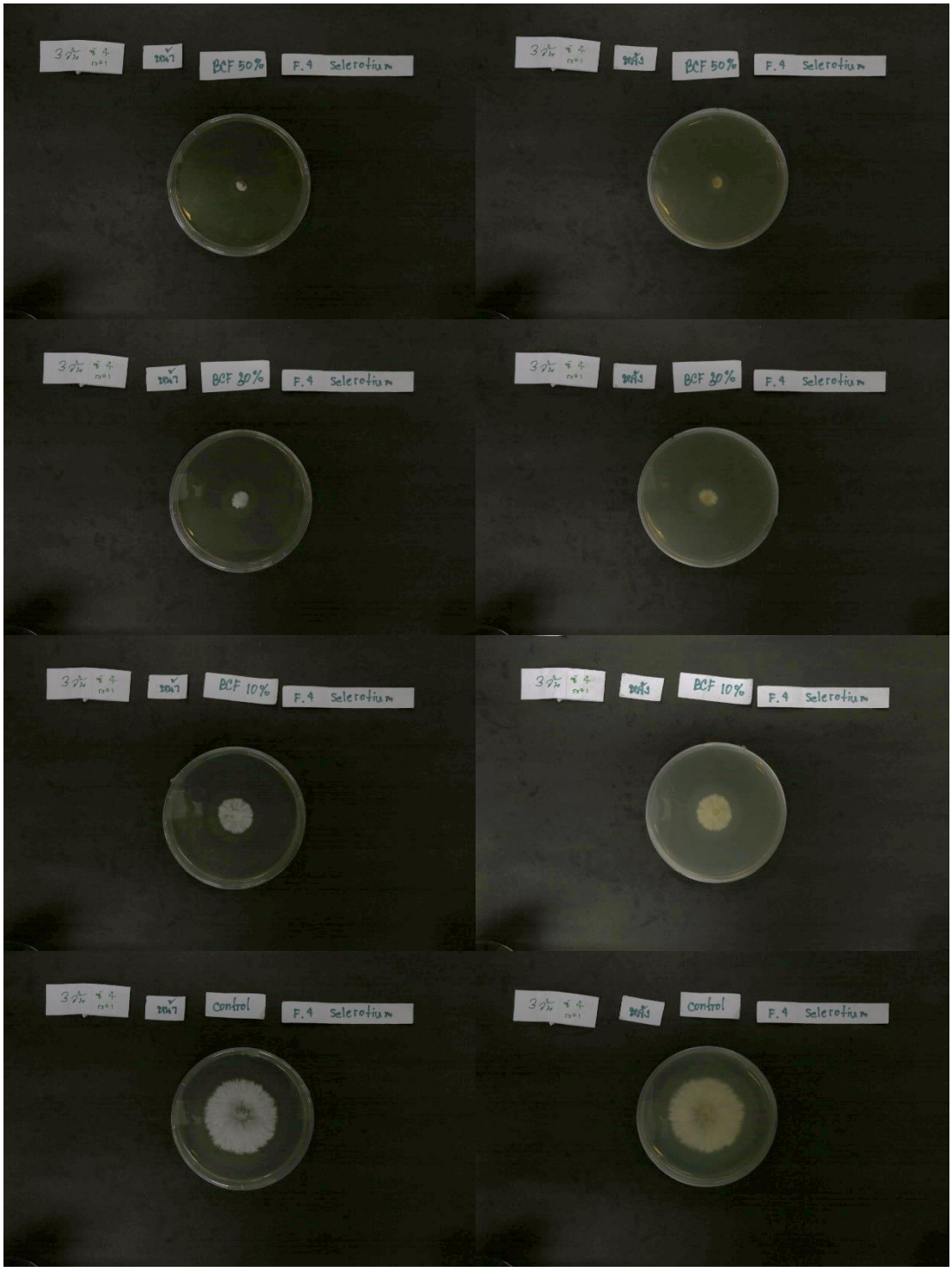

หน้า
control
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
control
F.(3)4 Cladosporium
หน้า
BCF 20%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 20%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
control
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
control
F.(2)1 Colleetotrichum

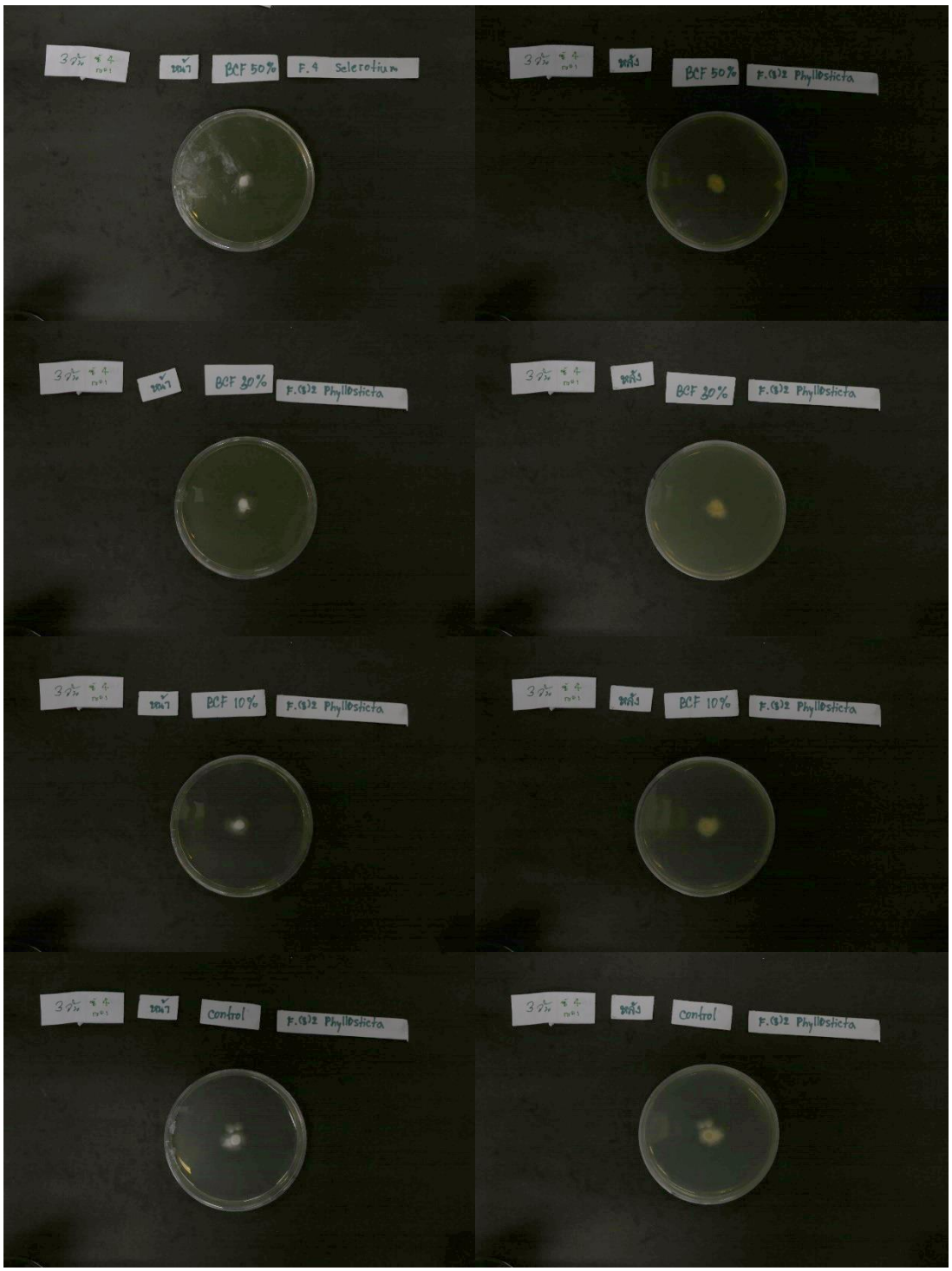

หน้า BCF 50% F.5 Fusarium
หลัง BCF 50% F.5 Fusarium
หน้า BCF 10% F.5 Fusarium
หลัง BCF 10% F.5 Fusarium
หน้า control F.5 Fusarium
หลัง control F.5 Fusarium
หลัง BCF 50% F.(S)2 Phyllosticta
หน้า BCF 30% F.(S)2 Phyllosticta

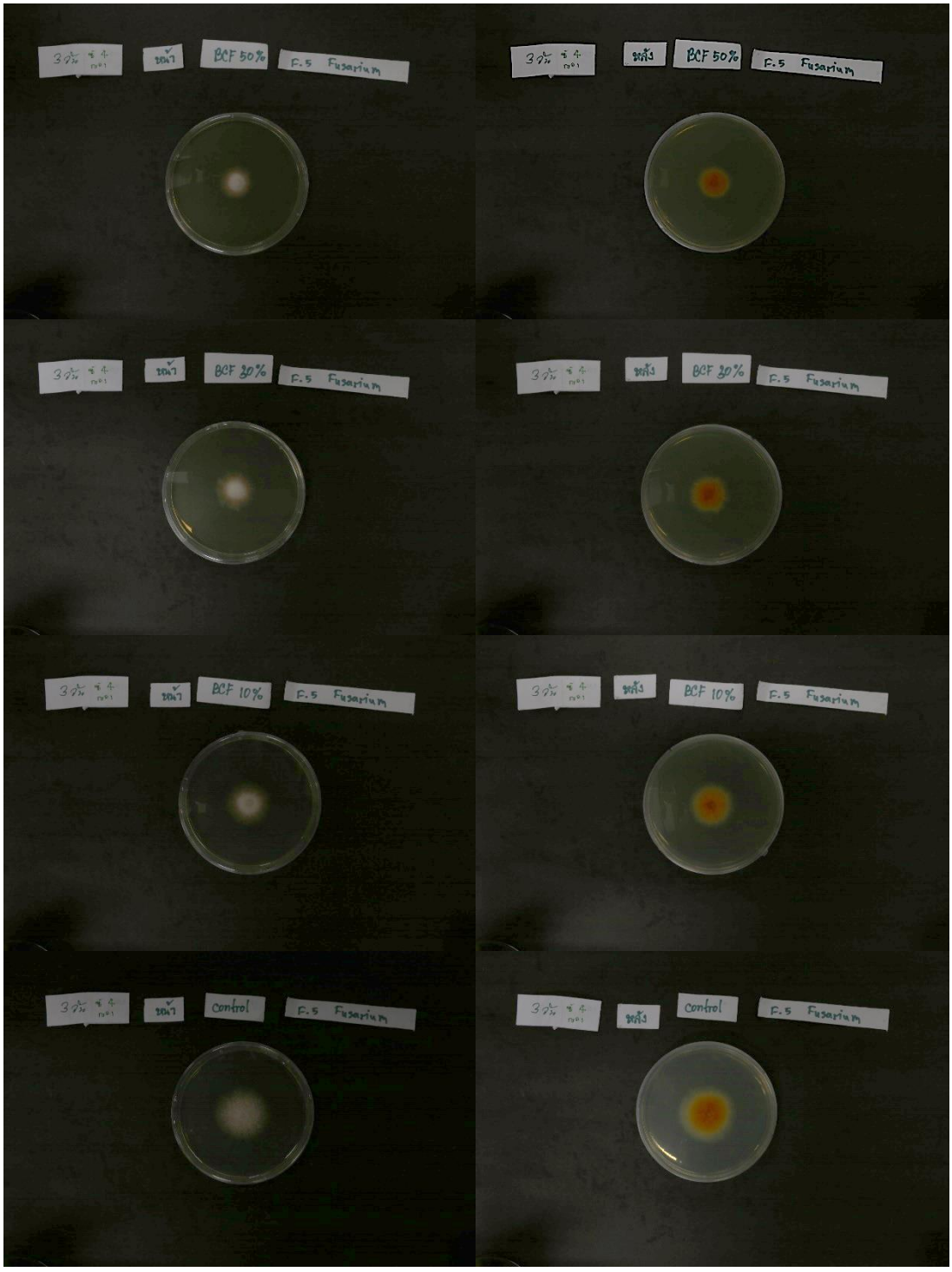
ภาคผนวกที่ 13 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 3 วัน



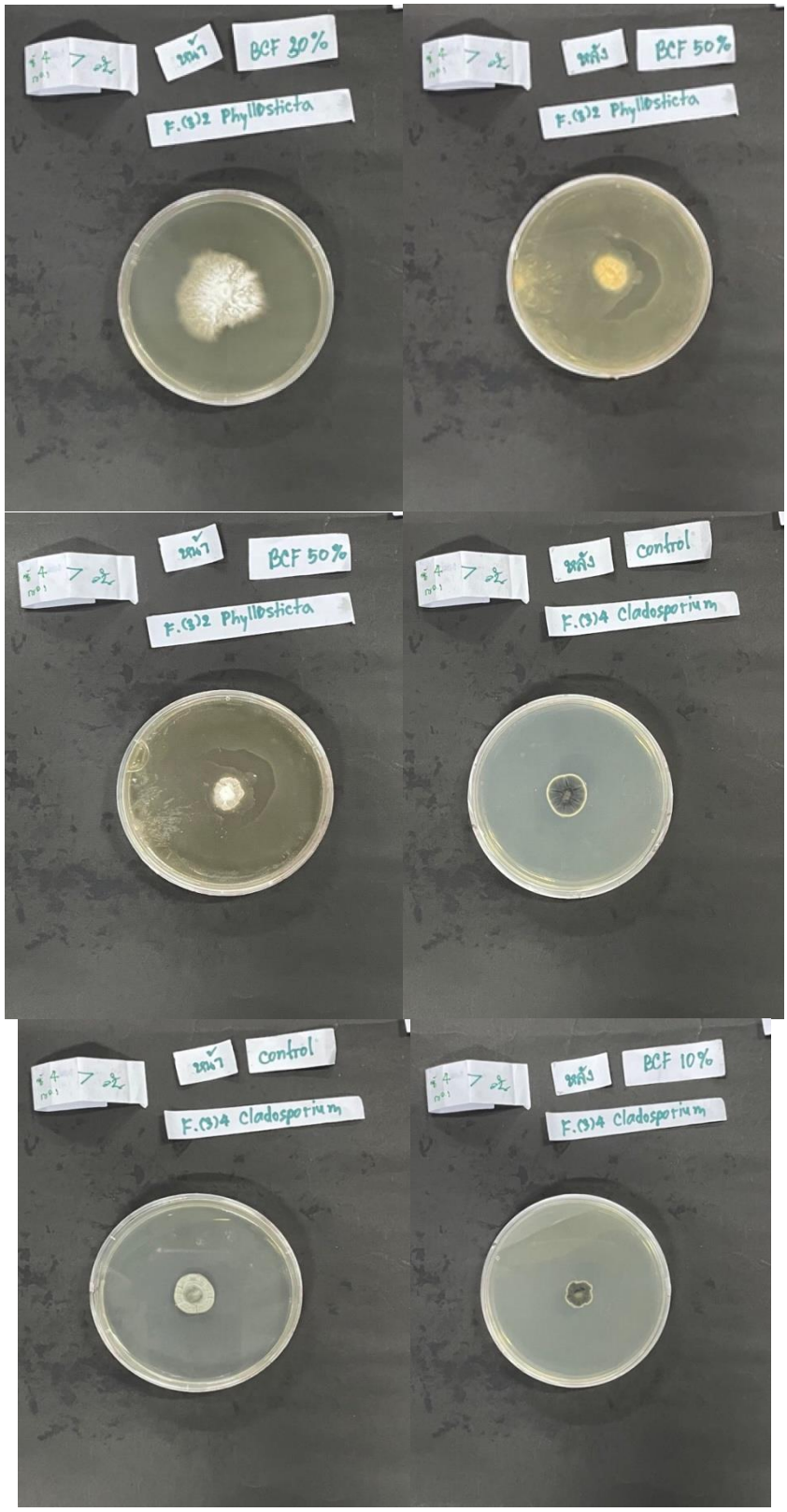

หน้า
BCF 50%
F.a)1 Collectotrichum
หลัง
BCF 50%
F.a)1 Collectotrichum
หน้า
BCF 30%
F.a)1 Collectotrichum
หลัง
BCF 30%
F.a)1 Collectotrichum
หน้า
BCF 10%
F.a)1 Collectotrichum
หลัง
BCF 10%
F.a)1 Collectotrichum
หน้า
control
F.a)1 Collectotrichum
หลัง
control
F.a)1 Collectotrichum

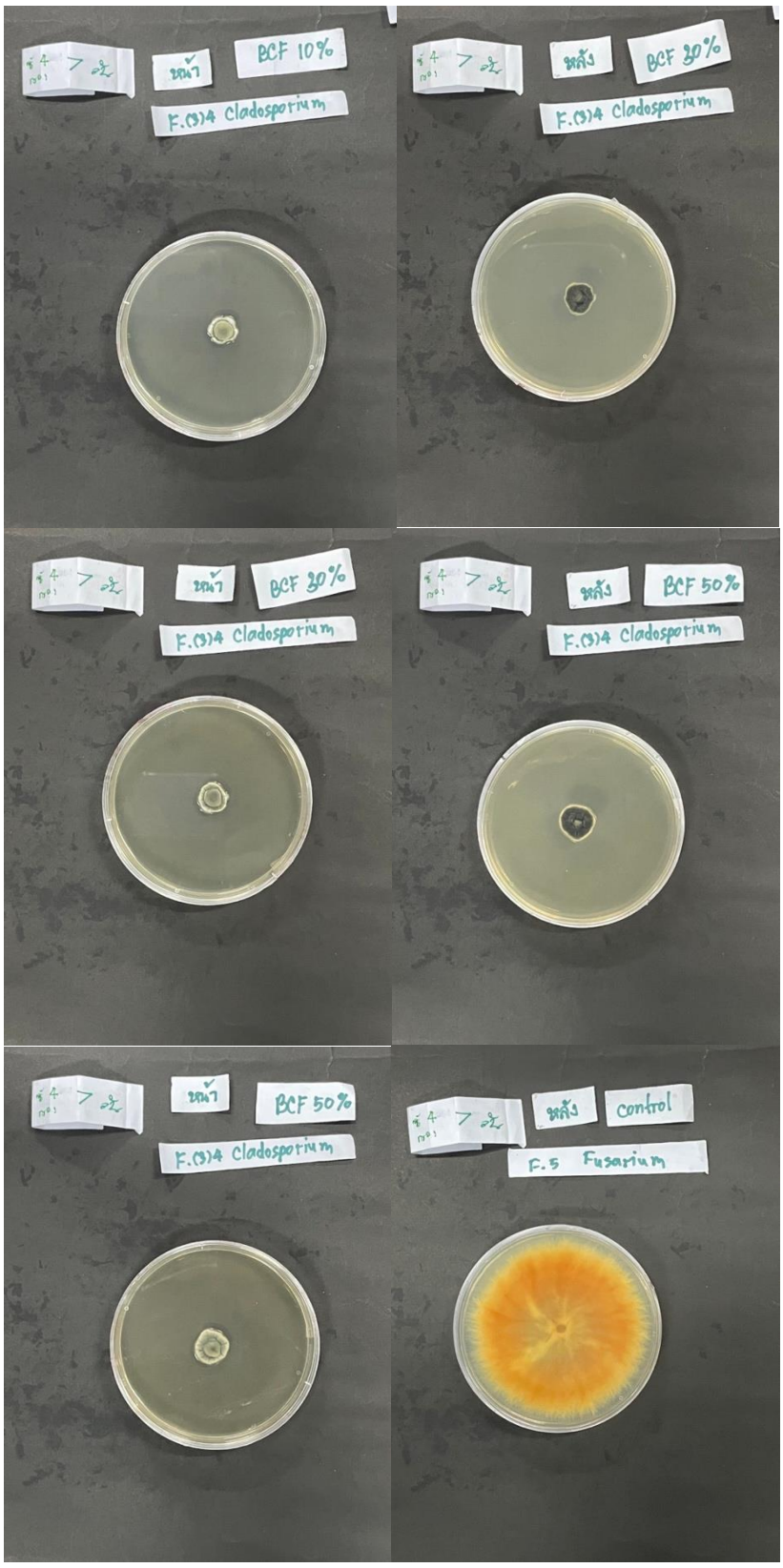

BCF 50%
F.4 Selerotium
BCF 30%
F.4 Selerotium
BCF 10%
F.4 Selerotium
control
F.4 Selerotium

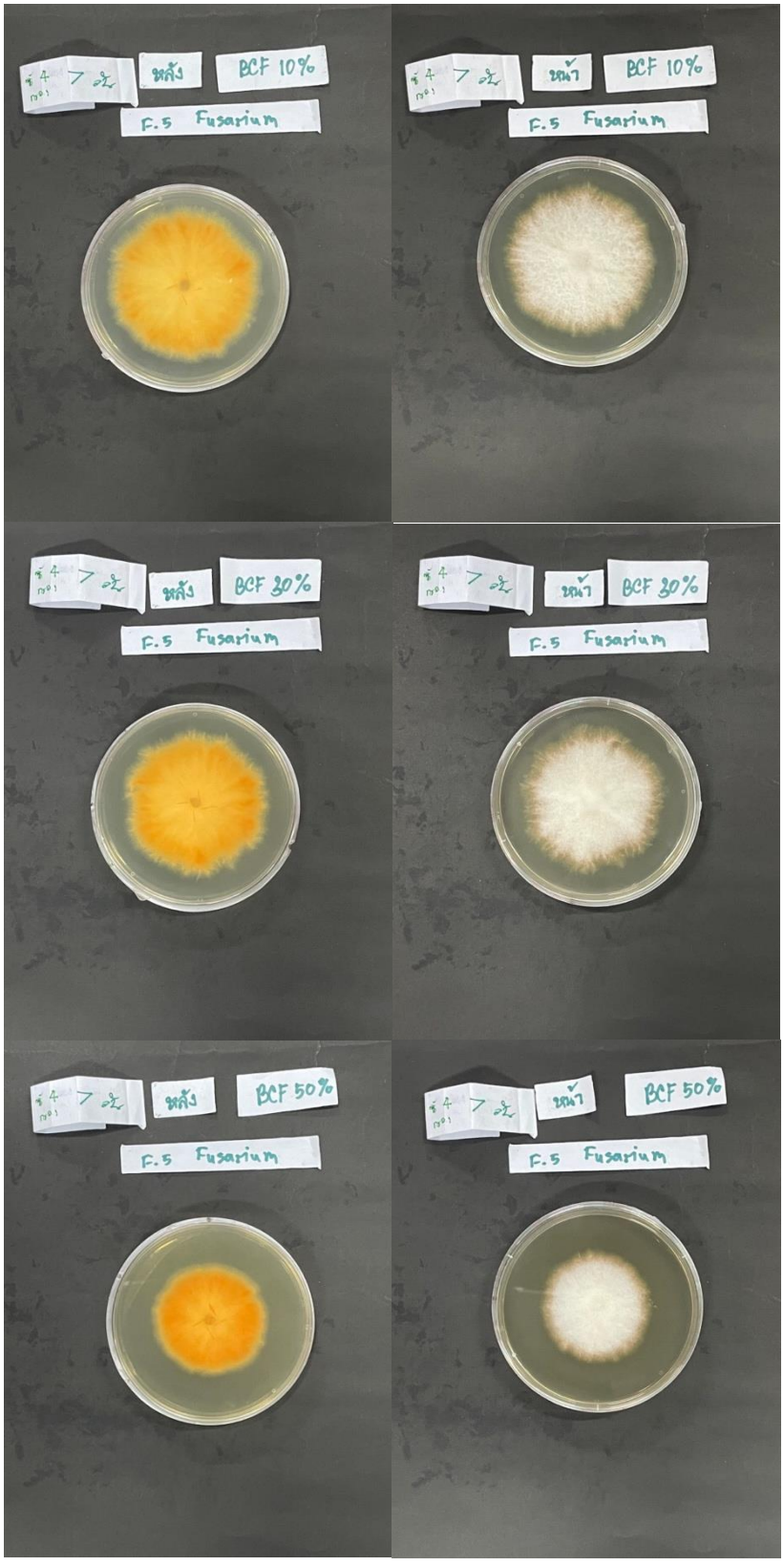

BCF 50%
F.4 Sclerotium
BCF 50%
F.(S)2 Phyllosticta
BCF 30%
F.(S)2 Phyllosticta
BCF 30%
F.(S)2 Phyllosticta
BCF 10%
F.(S)2 Phyllosticta
BCF 10%
F.(S)2 Phyllosticta
Control
F.(S)2 Phyllosticta
Control
F.(S)2 Phyllosticta


หน้า
BCF 50%
F.5 Fusarium
หลัง
BCF 50%
F.5 Fusarium
หน้า
BCF 30%
F.5 Fusarium
หลัง
BCF 30%
F.5 Fusarium
หน้า
BCF 10%
F.5 Fusarium
หลัง
BCF 10%
F.5 Fusarium
หน้า
control
F.5 Fusarium
หลัง
control
F.5 Fusarium

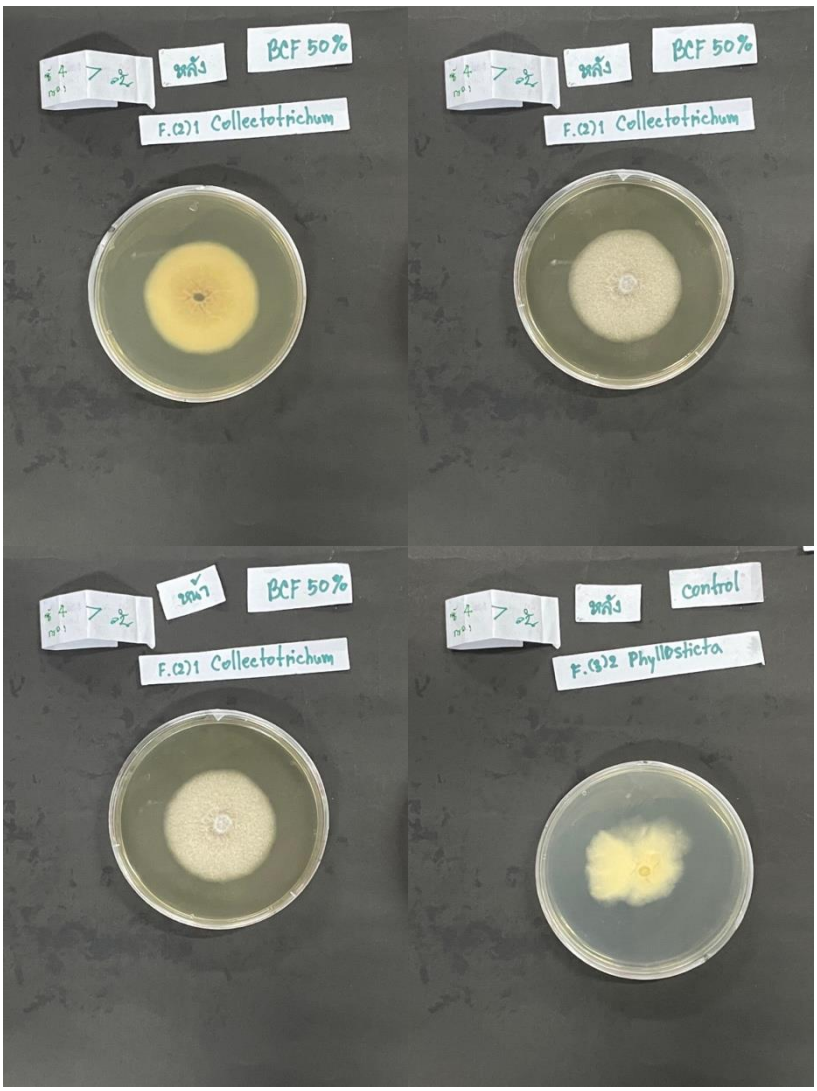
ภาคผนวกที่ 14 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม lipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 7 วัน

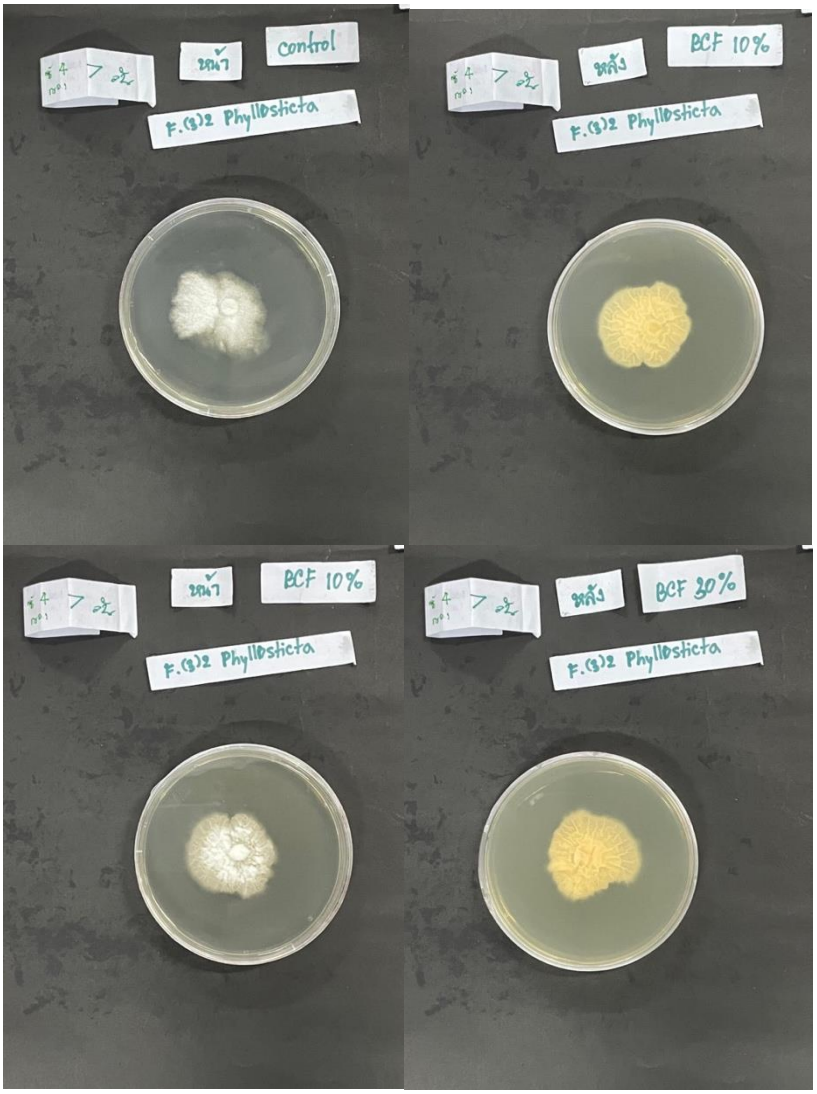



หน้า
BCF 10%
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
BCF 20%
F.(3)4 Cladosporium
หน้า
BCF 20%
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
BCF 50%
F.(3)4 Cladosporium
หน้า
BCF 50%
F.(3)4 Cladosporium
หลัง
control
F.5 Fusarium

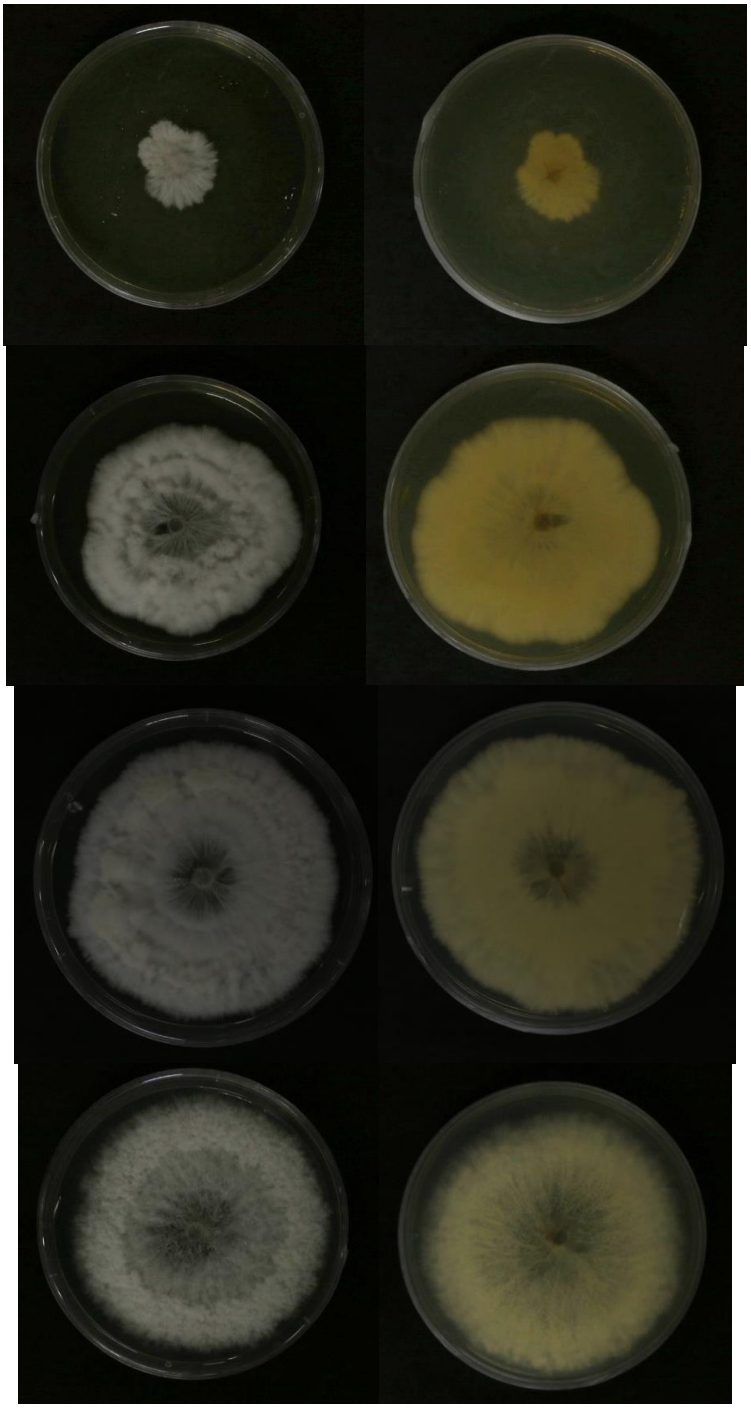

ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หลัง
BCF 10%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หน้า
BCF 10%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หลัง
BCF 30%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หน้า
BCF 30%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หลัง
BCF 50%
F.5 Fusarium
ซ้ำ 4 กลุ่ม 1 7 วัน
หน้า
BCF 50%
F.5 Fusarium

หลัง
control
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
control
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 10%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 30%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 30%
F.(2)1 Colleetotrichum

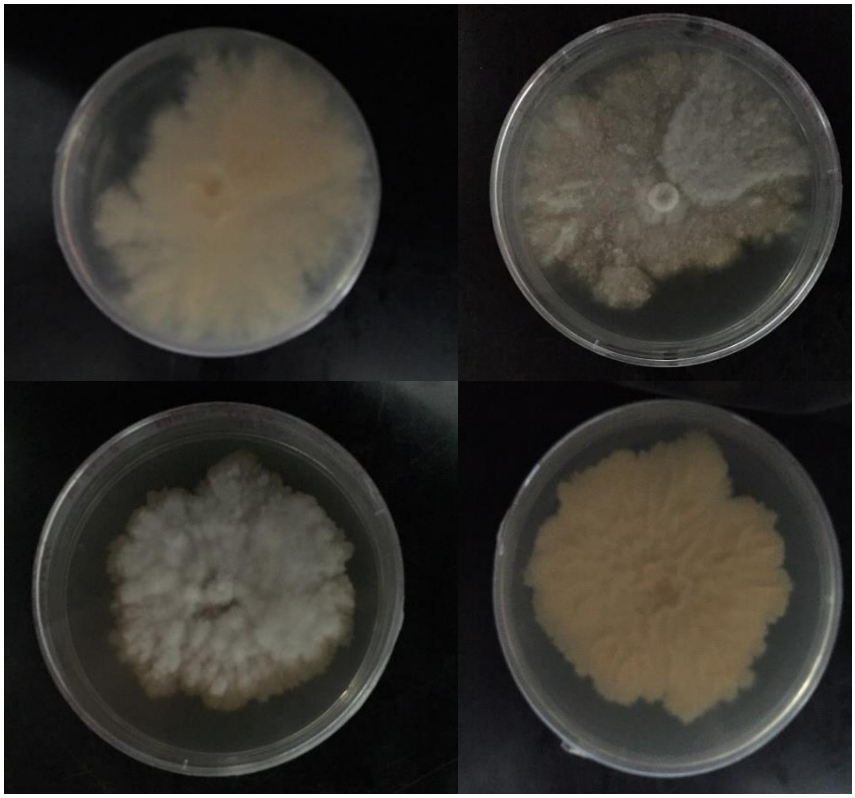

หลัง
BCF 50%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
BCF 50%
F.(2)1 Colleetotrichum
หน้า
BCF 50%
F.(2)1 Colleetotrichum
หลัง
control
F.(3)2 Phyllosticta


หน้า
control
F.(3)2 Phyllosticta
หลัง
BCF 10%
F.(3)2 Phyllosticta
หน้า
BCF 10%
F.(3)2 Phyllosticta
หลัง
BCF 30%
F.(3)2 Phyllosticta

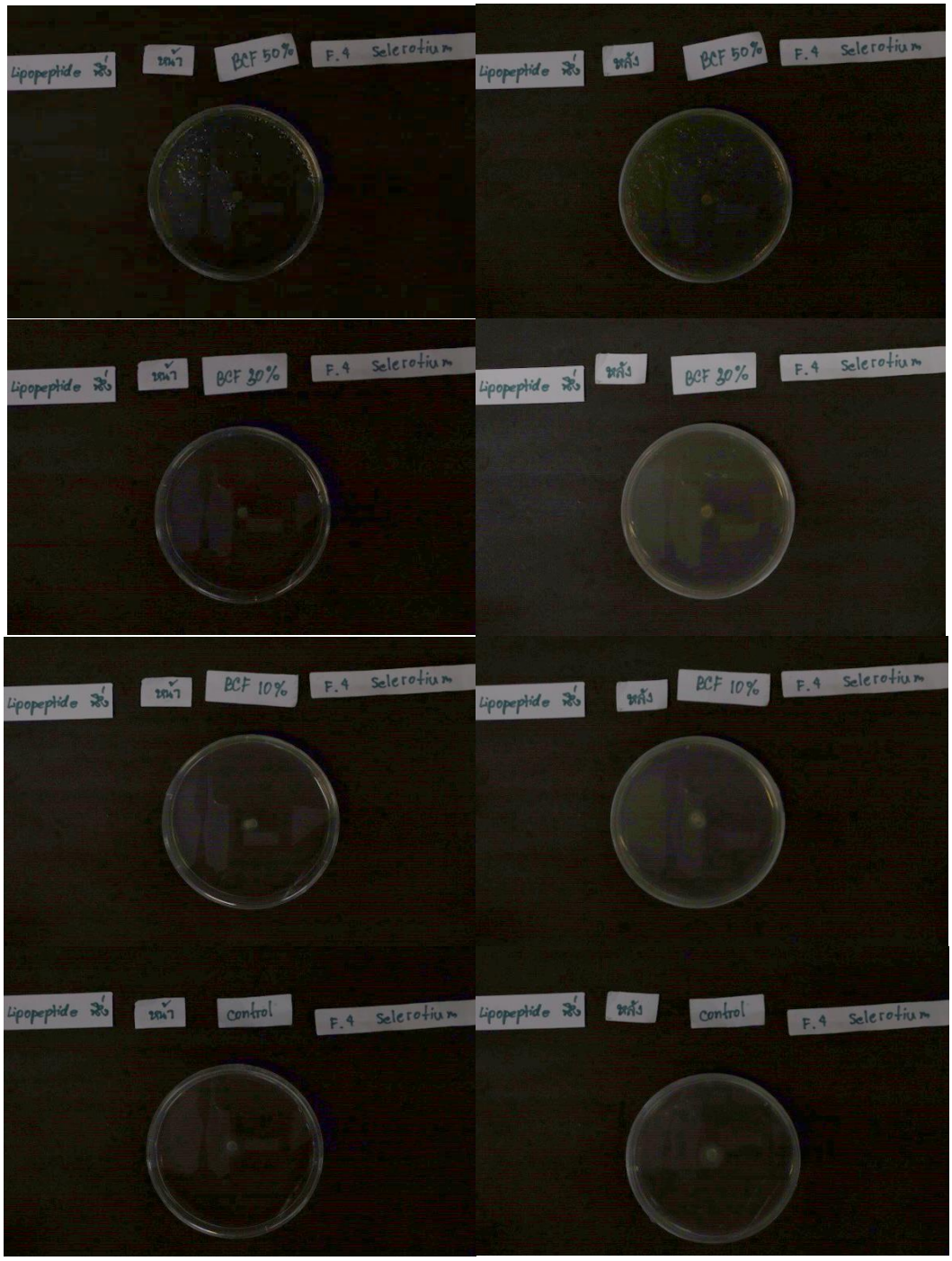
- ภาพเชื้อรา *Sclerotium* การทดลองซ้ำที่ 2 วันที่ 7 ด้านหน้าและด้านหลัง โดยมีลำดับความเข้มข้น 50% , 30% , 10% และชุดควบคุม ตามลำดับ

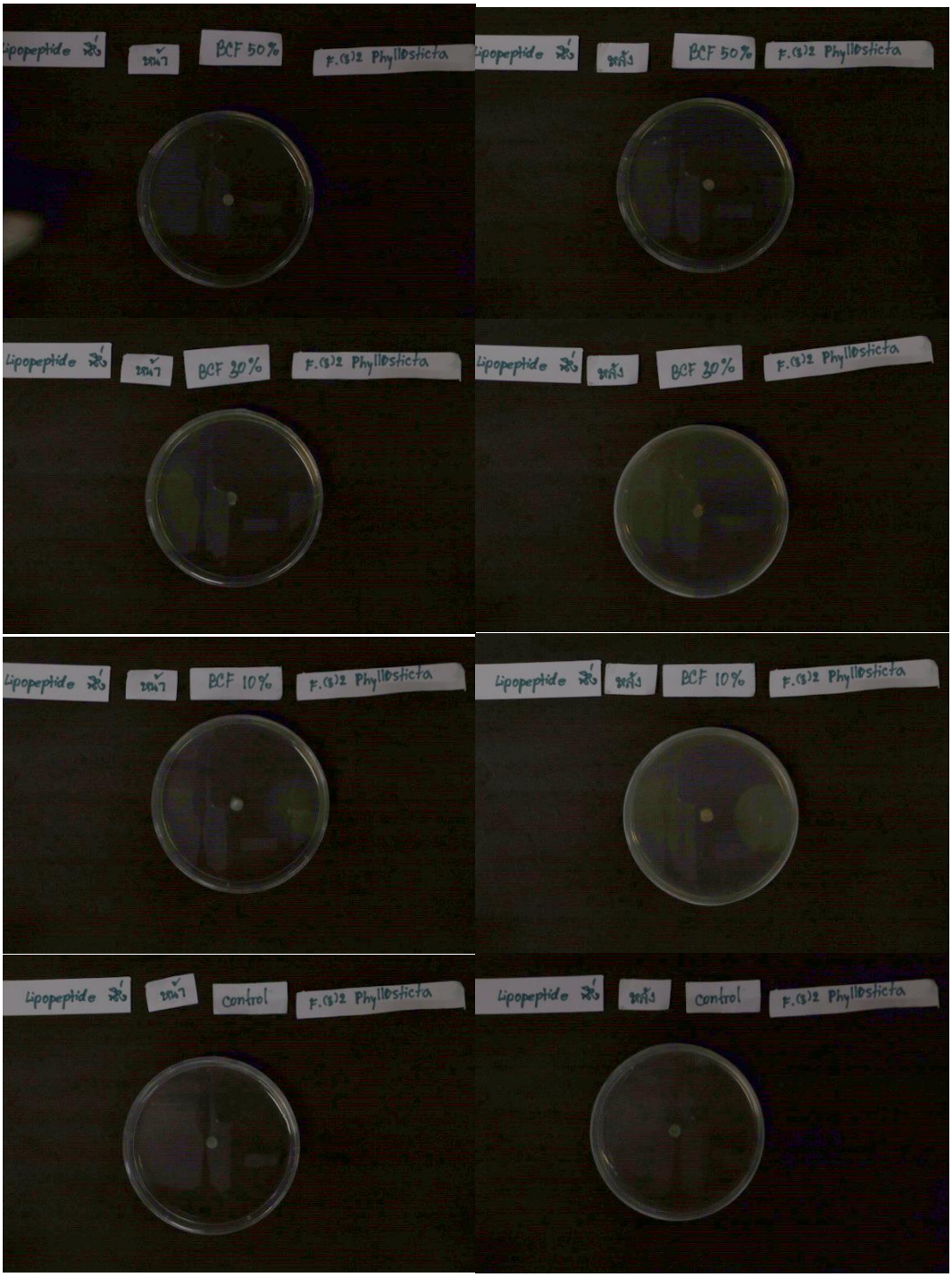


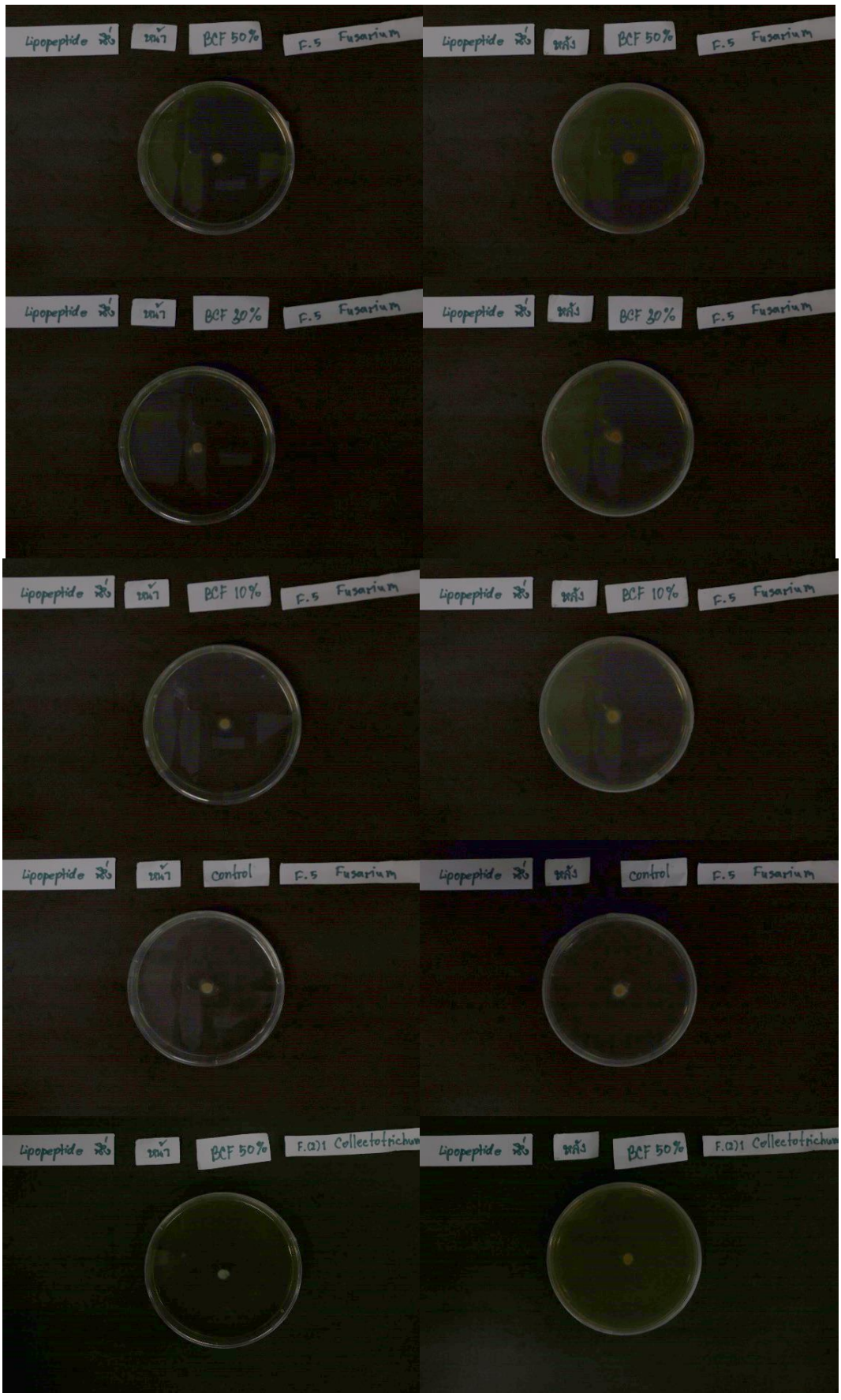
ภาคผนวกที่ 15 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *phyllosticta* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมlipopeptide ชุดการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 14 วัน

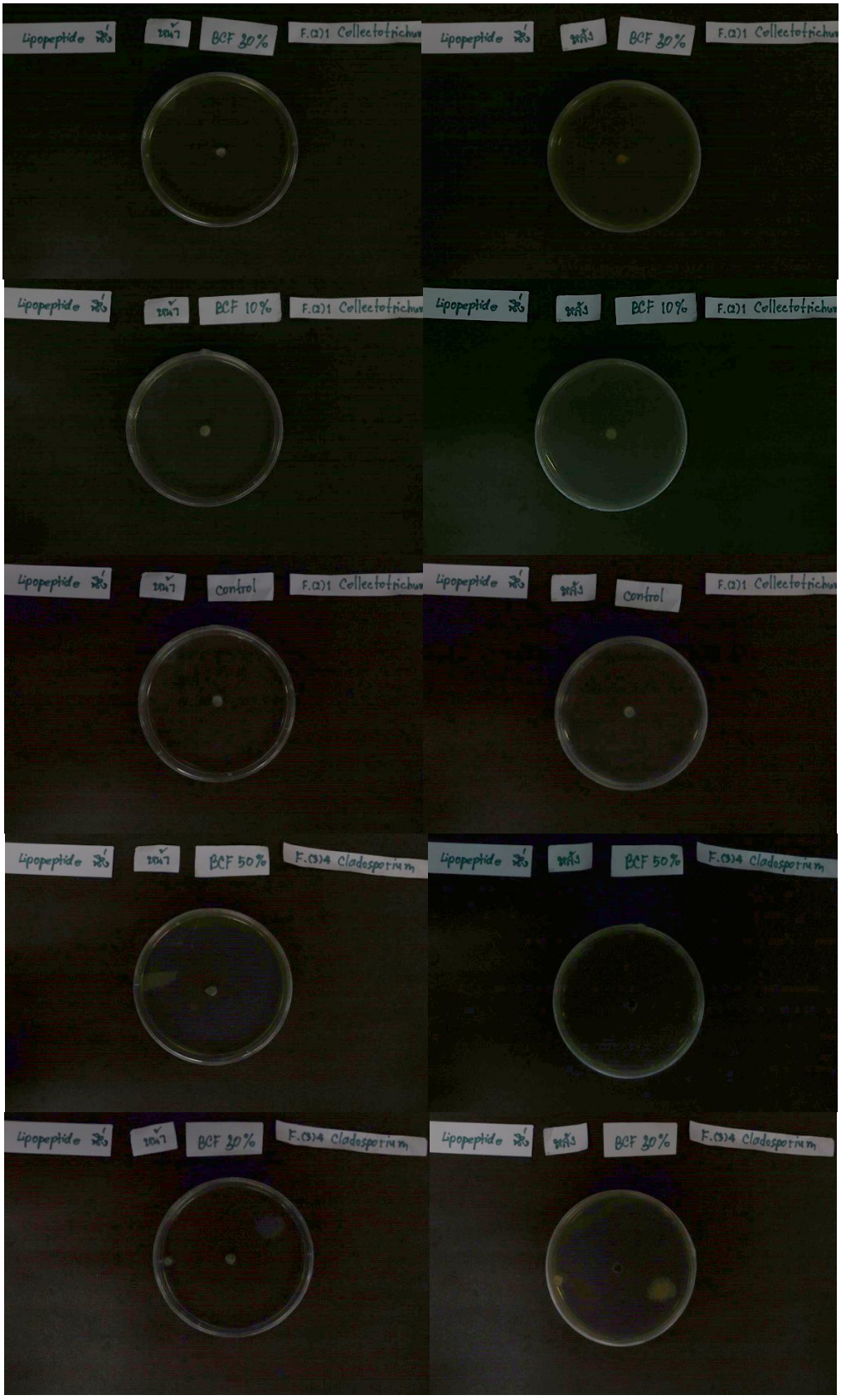


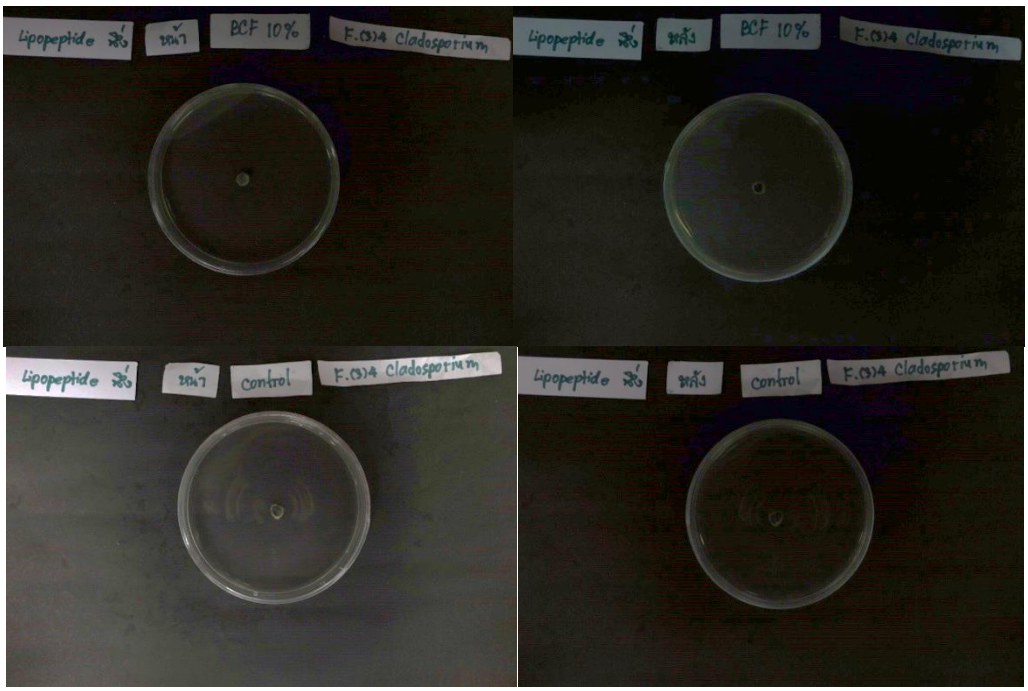
ภาคผนวกที่ 16 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 1 วัน



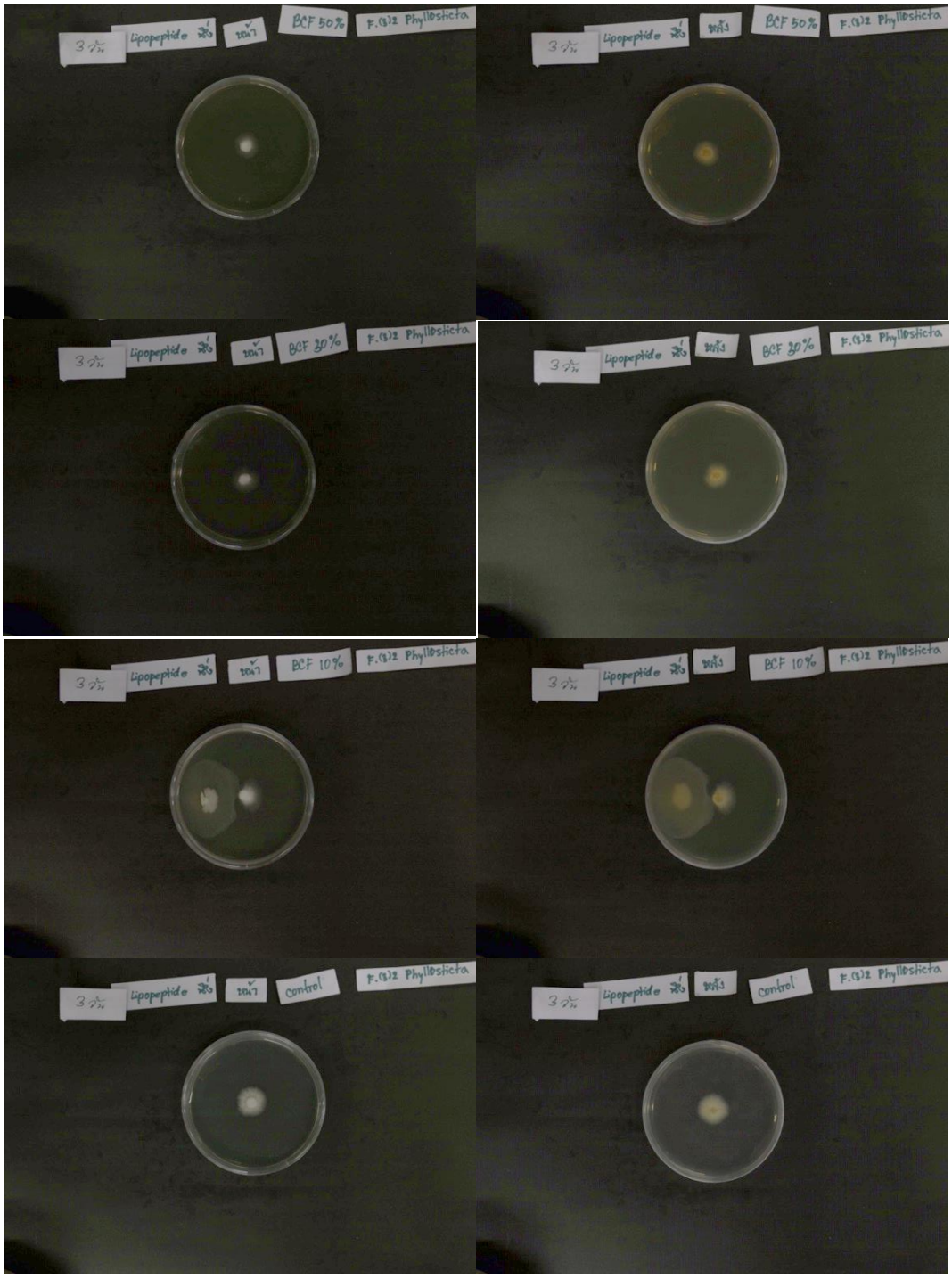

Lipopeptide หน้า BCF 50% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หลัง BCF 50% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หน้า BCF 30% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หลัง BCF 30% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หน้า BCF 10% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หลัง BCF 10% F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หน้า control F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide หลัง control F.(S)2 Phyllosticta

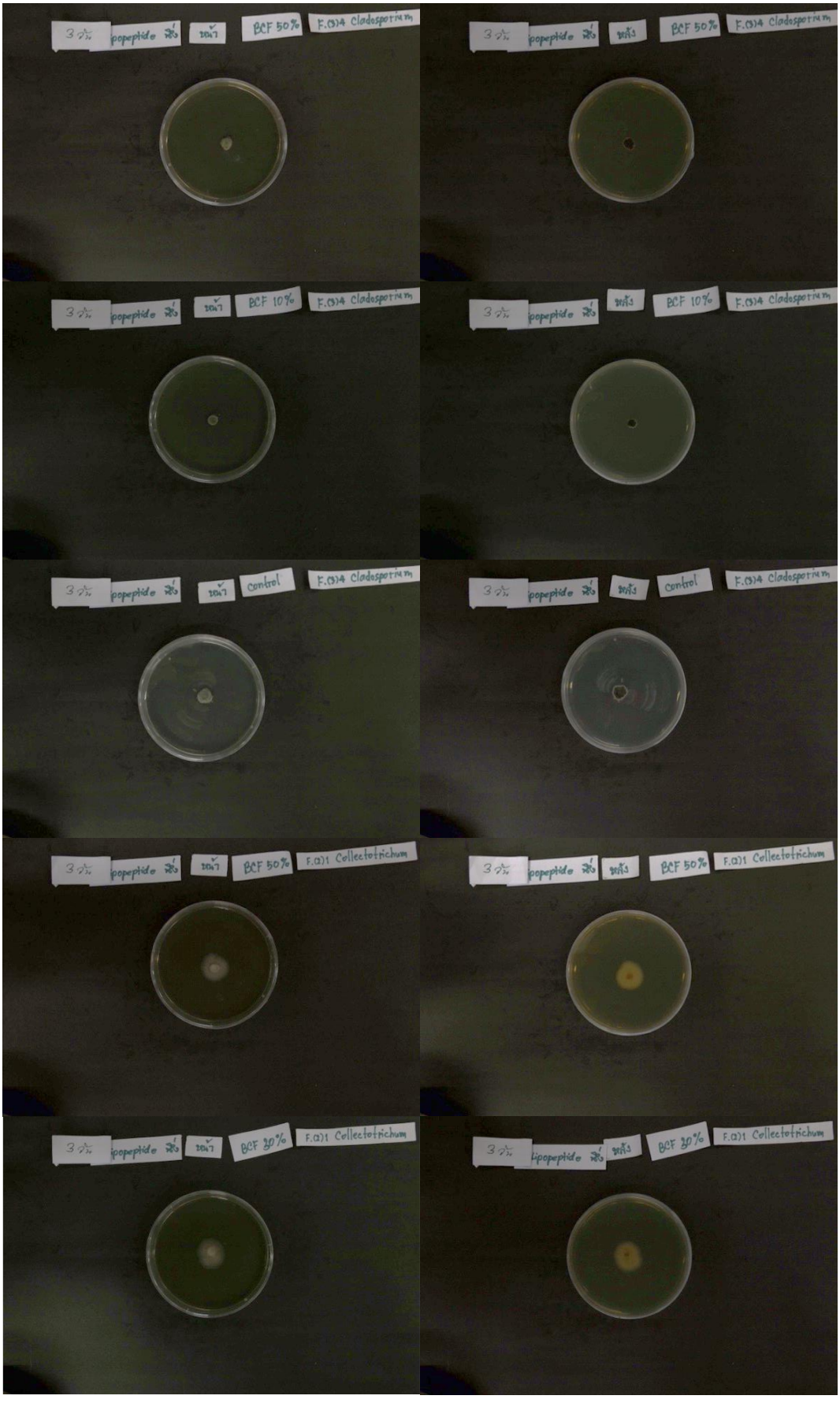

Lipopeptide หัว หน้า BCF 50% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หลัง BCF 50% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หน้า BCF 30% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หลัง BCF 30% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หน้า BCF 10% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หลัง BCF 10% F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หน้า control F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หลัง control F.5 Fusarium
Lipopeptide หัว หน้า BCF 50% F.a)1 Collectotrichum
Lipopeptide หัว หลัง BCF 50% F.a)1 Collectotrichum

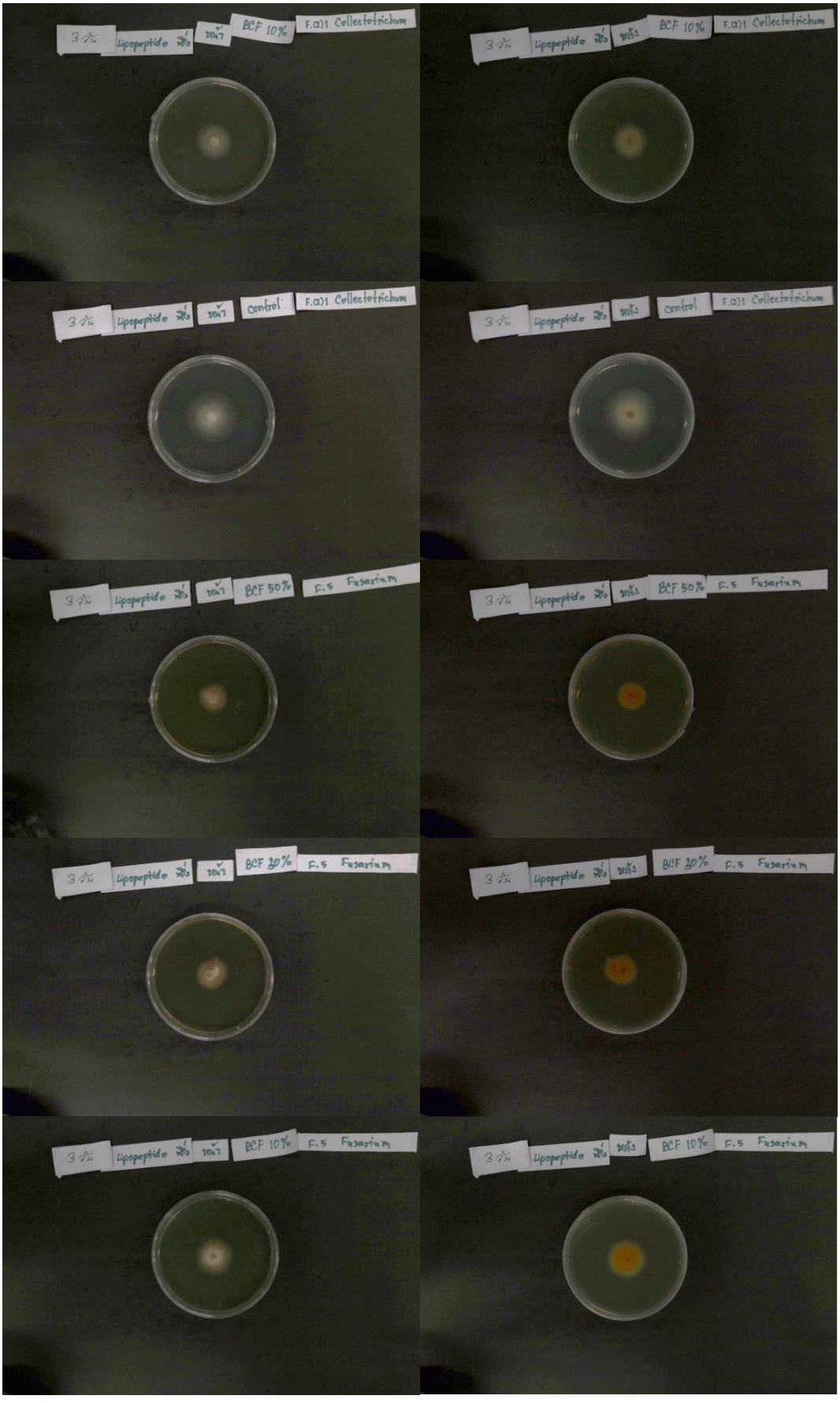

Lipopeptide หน้า BCF 30% F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หลัง BCF 30% F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หน้า BCF 10% F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หลัง BCF 10% F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หน้า control F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หลัง control F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide หน้า BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หลัง BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หน้า BCF 30% F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หลัง BCF 30% F.(3)4 Cladosporium

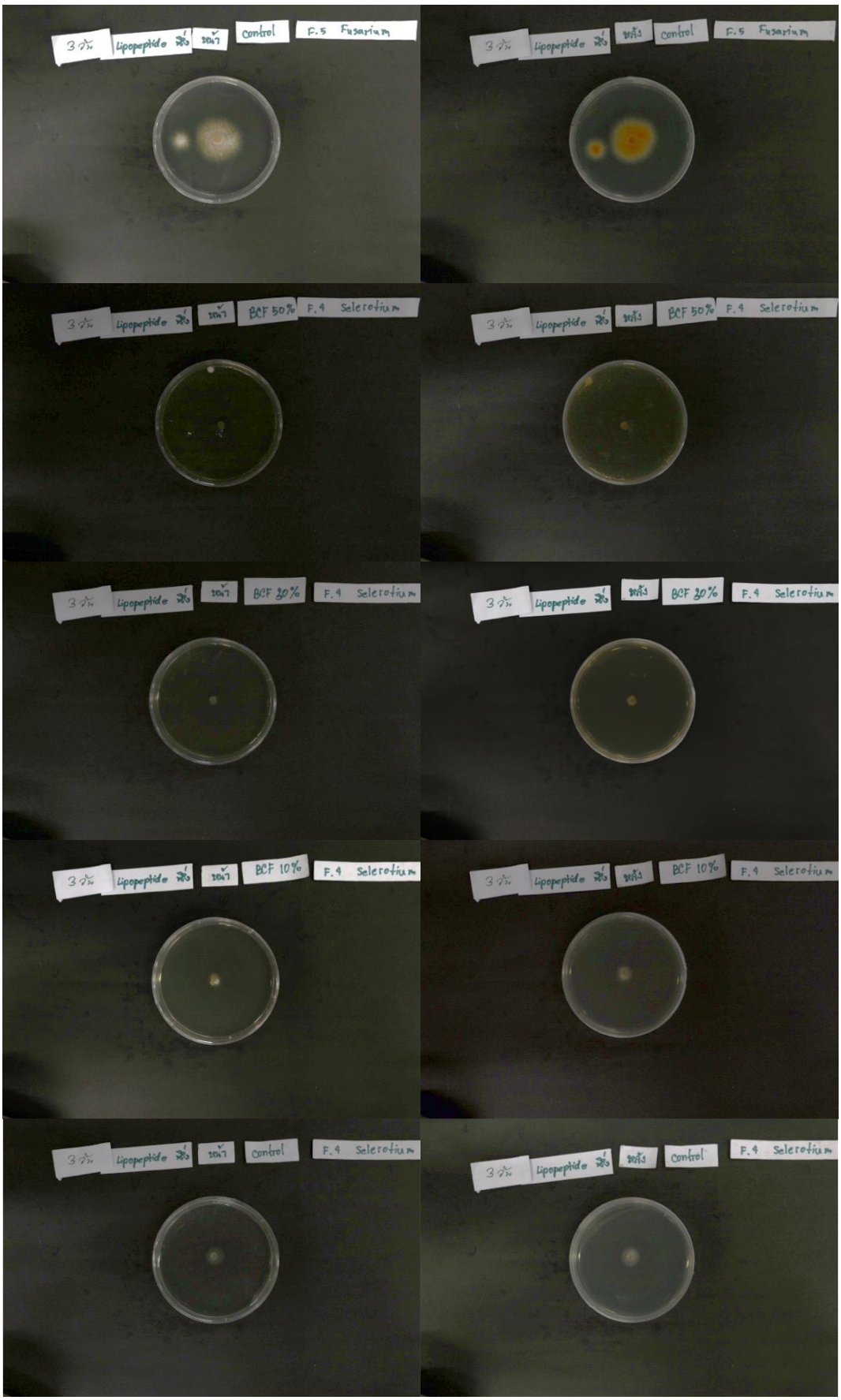

Lipopeptide หน้า BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หลัง BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หน้า control F.(3)4 Cladosporium
Lipopeptide หลัง control F.(3)4 Cladosporium

ภาคผนวกที่ 17 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 3 วัน

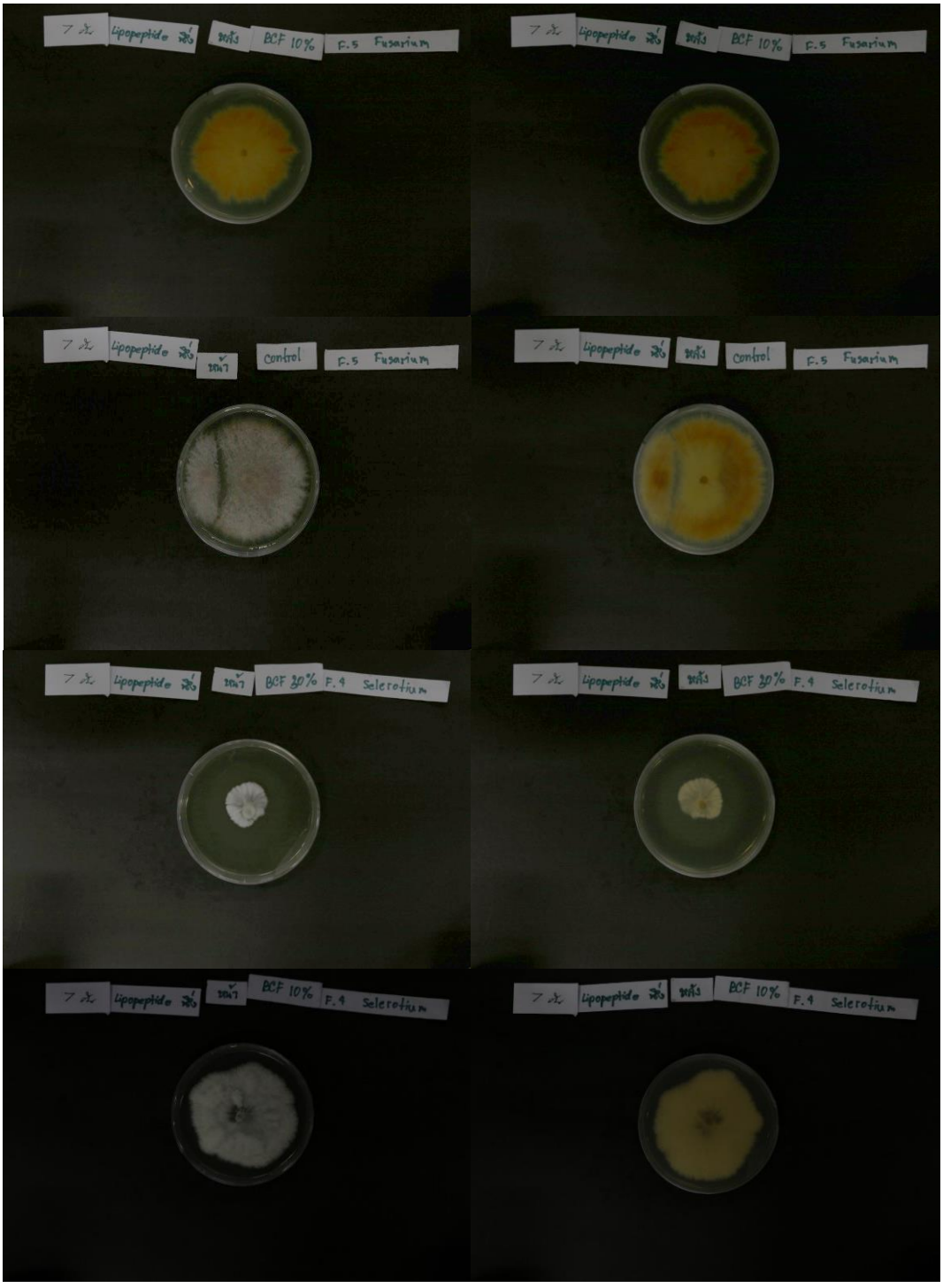


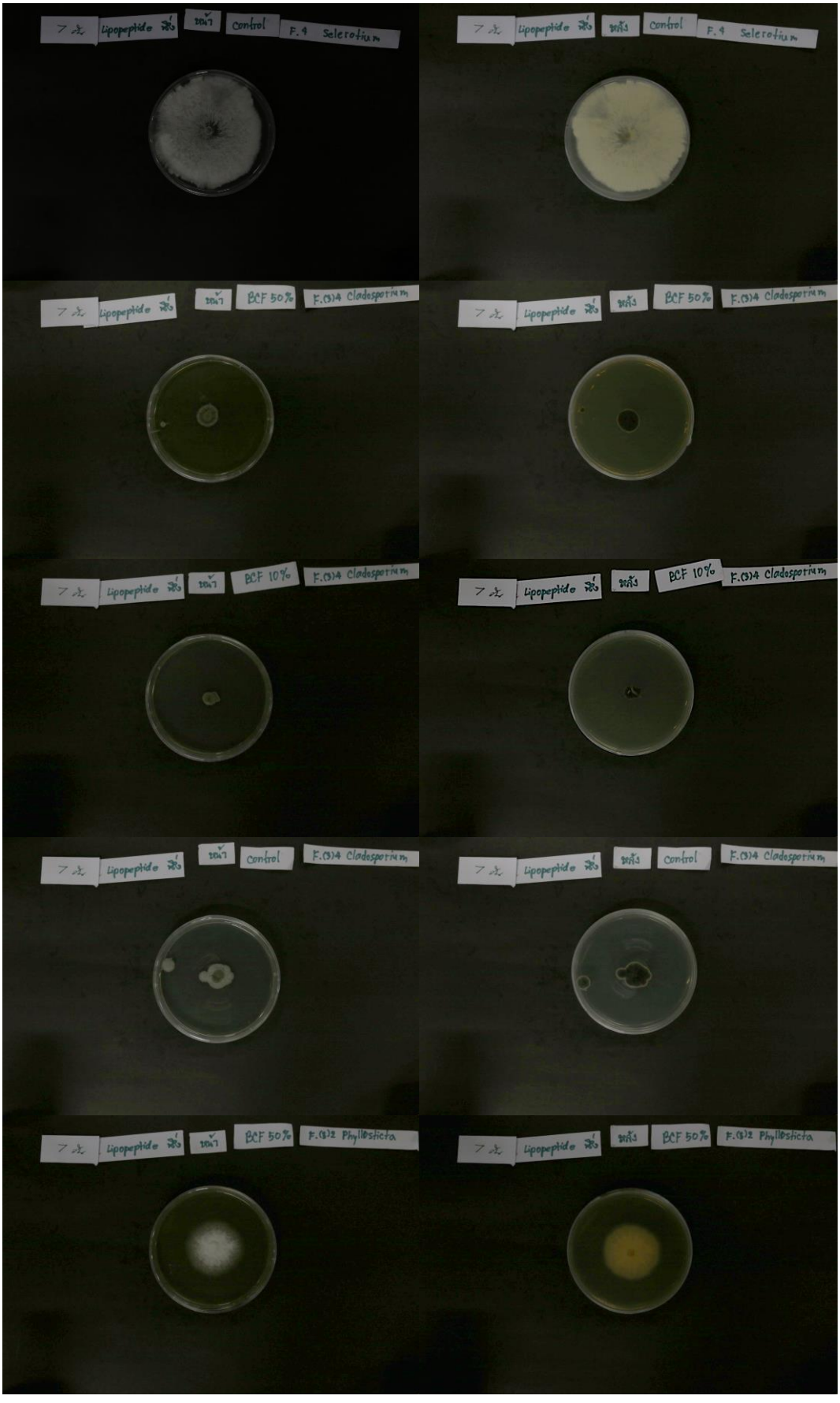

3 วัน lipopeptide หน้า BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หลัง BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หน้า BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หลัง BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หน้า control F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หลัง control F.(3)4 Cladosporium
3 วัน lipopeptide หน้า BCF 50% F.(2)1 Collectotrichum
3 วัน lipopeptide หลัง BCF 50% F.(2)1 Collectotrichum
3 วัน lipopeptide หน้า BCF 20% F.(2)1 Collectotrichum
3 วัน Lipopeptide หลัง BCF 20% F.(2)1 Collectotrichum

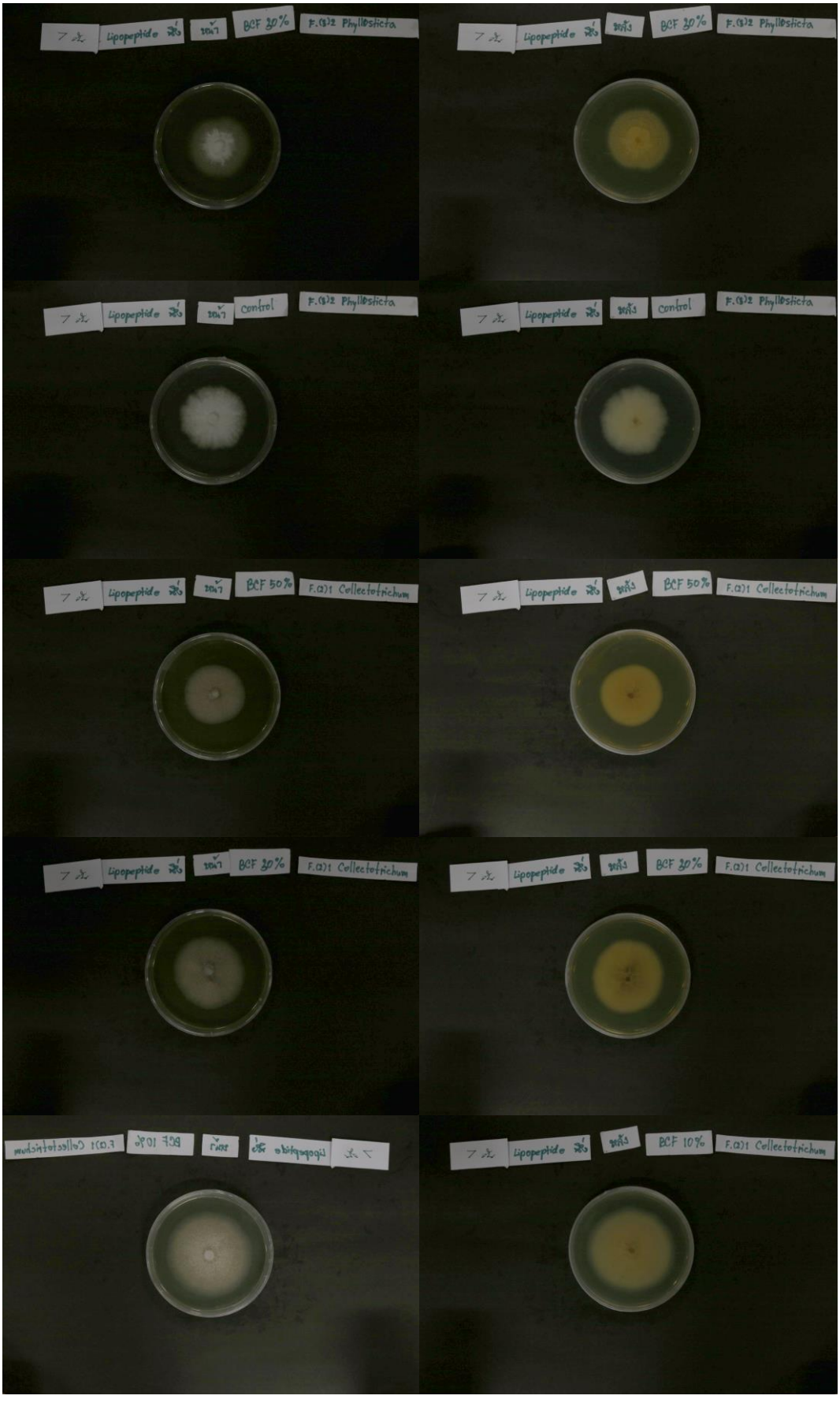

3% Lipopeptide
BCF 10%
F.o)1 Collectotrichum
3% Lipopeptide
control
F.o)1 Collectotrichum
3% Lipopeptide
BCF 50%
F.s Fusarium
3% Lipopeptide
BCF 30%
F.s Fusarium
3% Lipopeptide
BCF 10%
F.s Fusarium

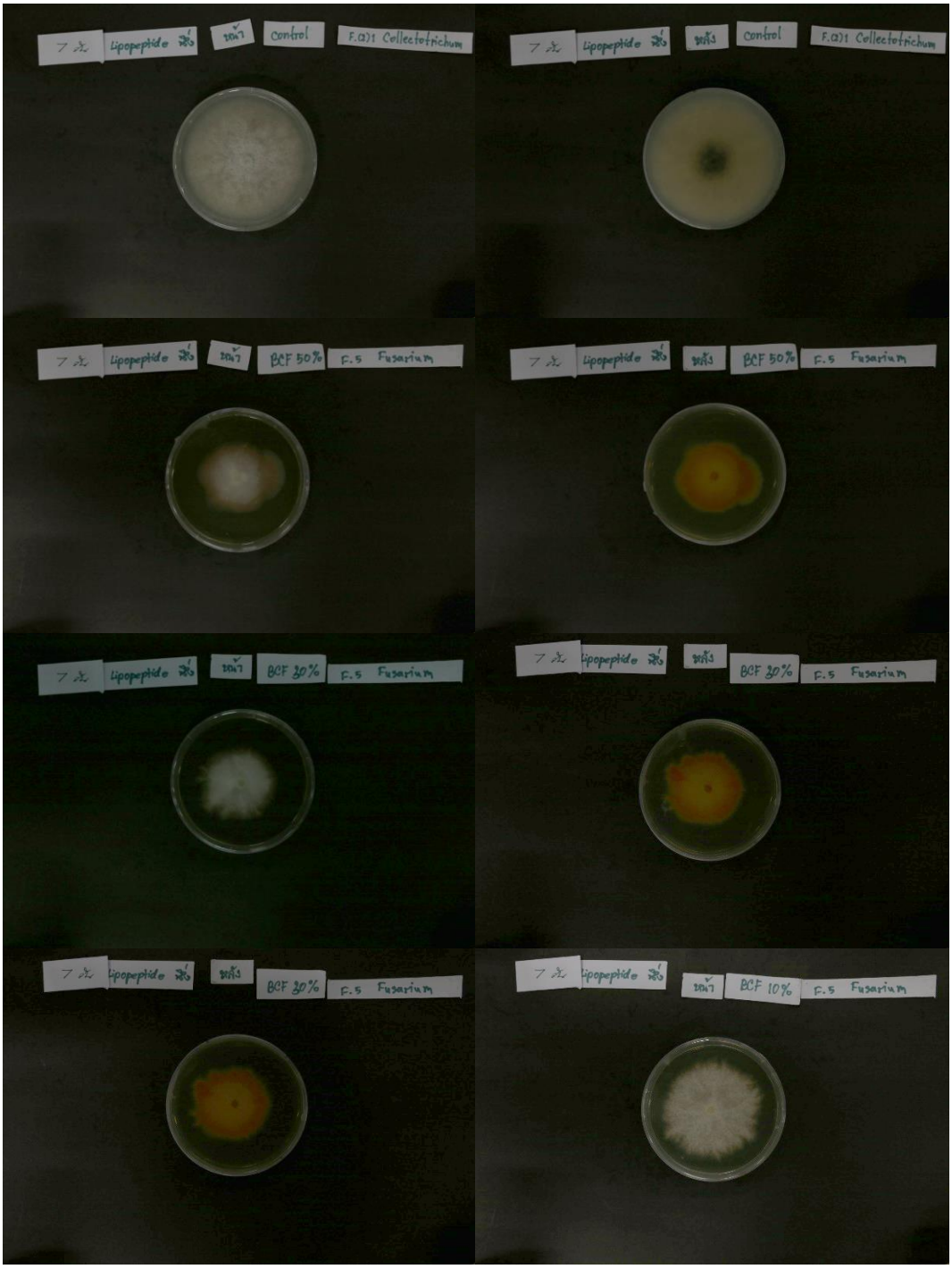

3 วัน Lipopeptide หน้า control F.5 Fusarium
3 วัน Lipopeptide หลัง control F.5 Fusarium
3 วัน Lipopeptide หน้า BCF 50% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หลัง BCF 50% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หน้า BCF 30% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หลัง BCF 30% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หน้า BCF 10% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หลัง BCF 10% F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หน้า control F.4 Selerotium
3 วัน Lipopeptide หลัง control F.4 Selerotium

ภาคผนวกที่ 18 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 7 วัน

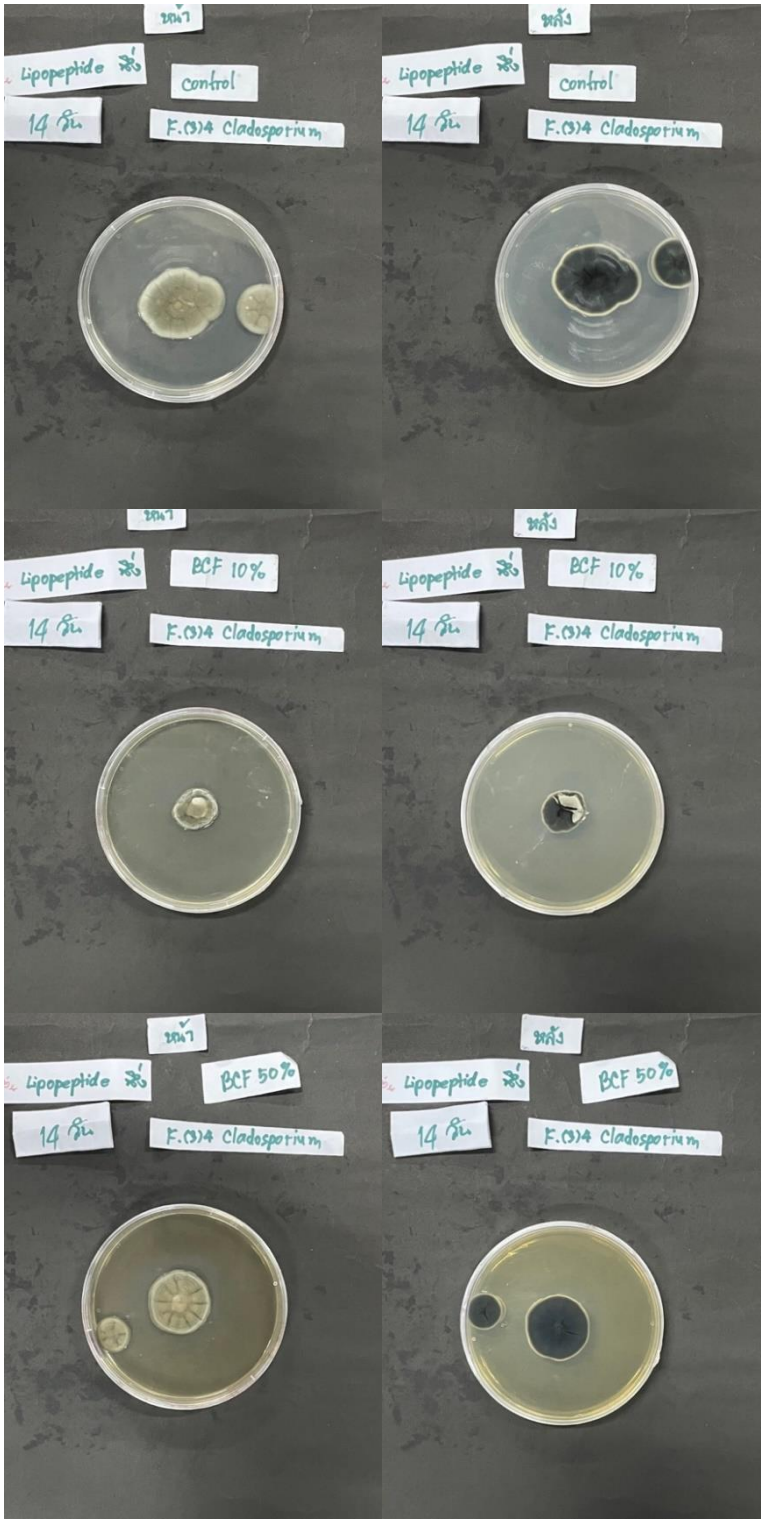



ไม่ Lipopeptide ฟ้า หน้า Control F.4 Selerotium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หลัง Control F.4 Selerotium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หน้า BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หลัง BCF 50% F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หน้า BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หลัง BCF 10% F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หน้า Control F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หลัง Control F.(3)4 Cladosporium
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หน้า BCF 50% F.(3)2 Phyllosticta
ไม่ Lipopeptide ฟ้า หลัง BCF 50% F.(3)2 Phyllosticta


Lipopeptide
BCF 30%
F.(1)2 Phyllosticta
Lipopeptide
BCF 30%
F.(1)2 Phyllosticta
Lipopeptide
control
F.(1)2 Phyllosticta
Lipopeptide
control
F.(1)2 Phyllosticta
Lipopeptide
BCF 50%
F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide
BCF 50%
F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide
BCF 30%
F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide
BCF 30%
F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide
BCF 10%
F.(2)1 Collectotrichum
Lipopeptide
BCF 10%
F.(2)1 Collectotrichum


ไม่ Lipopeptide ไม่ หน้า control F.Q11 Collectotrichum
ไม่ Lipopeptide ไม่ หลัง control F.Q11 Collectotrichum
ไม่ Lipopeptide ไม่ หน้า BCF 50% F.5 Fusarium
ไม่ Lipopeptide ไม่ หลัง BCF 50% F.5 Fusarium
ไม่ Lipopeptide ไม่ หน้า BCF 30% F.5 Fusarium
ไม่ Lipopeptide ไม่ หลัง BCF 30% F.5 Fusarium
ไม่ Lipopeptide ไม่ หลัง BCF 30% F.5 Fusarium
ไม่ Lipopeptide ไม่ หน้า BCF 10% F.5 Fusarium

ภาคผนวกที่ 19 ภาพการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *phyllosticta* sp. และ *cladosporium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสม autoclave lipopeptide ระยะเวลา 14 วัน



Lipopeptide สิ่ง
หน้า
control
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide สิ่ง
หลัง
control
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide สิ่ง
หน้า
BCF 30%
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide สิ่ง
หลัง
BCF 30%
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide สิ่ง
หน้า
BCF 50%
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta
Lipopeptide สิ่ง
หลัง
BCF 50%
14 วัน
F.(S)2 Phyllosticta