



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ประสิทธิภาพของการใช้ Plant Growth Promoting Rhizobacteria ร่วมกันสำหรับกระตุ้นการ
สร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคพืชหลายชนิดในพื้นที่ซึ่งมี
ความแตกต่างกันทางด้านภูมิศาสตร์

โดย รศ.ดร. กัญชลี เจตียนนท์

เดือน สิงหาคม 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ประสิทธิภาพของการใช้ Plant Growth Promoting Rhizobacteria ร่วมกันสำหรับกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคพืชหลายชนิดในพื้นที่ซึ่งมีความแตกต่างกันทางด้านภูมิศาสตร์

ผู้วิจัย รศ.ดร. กัญชลี เจริยานนท์

สังกัด ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ฯ ม.นเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ผลการทดลองที่ผ่านมาได้ชี้ให้เห็นว่า PGPR สองสายพันธุ์ที่เข้ากันได้สามารถกระตุ้นพืชต้านทานโรคได้หลากหลายชนิดทั้งในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว ซึ่งการศึกษาดังกล่าวได้นำมาสู่วัตถุประสงค์ของการวิจัยในโครงการนี้คือ 1) เพื่อประเมินประสิทธิภาพที่คงที่ของ PGPR ที่เข้ากันได้ในการกระตุ้นพืชสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่มีอยู่แล้วในพื้นที่เกษตรกร 2) เพื่อศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก และ 3) เพื่อศึกษาสิ่งป้องกันตนเองของพืชที่เกิดขึ้นในช่วงระยะแรกซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค ทำการทดลองที่แปลงเกษตรกรต่อเนื่อง 2 ปี โดยปีแรกได้ทำการศึกษา 2 พื้นที่ คือ ต.บึงพระ อ.เมือง จ.พิษณุโลก มีพืชทดสอบ 3 ชนิด ซึ่งรวมถึงแตงกวา พริกชี้ฟ้า และ มะเขือเทศ ส่วนปีที่ 2 ได้ทดลองอีก 3 พื้นที่คือ 1 พื้นที่ของ ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก และ 2 พื้นที่ของ ต.วัดพริก อ.เมือง จ.พิษณุโลก จากผลการศึกษาปีแรกพบว่าแตงกวาและมะเขือเทศทั้งสองพื้นที่ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับเชื้อ *B. pumilus* สายพันธุ์ IN937b ส่วนใหญ่ต้านทานโรคใบด่างและโรคใบม้วนเหลืองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบอีกว่าพริกชี้ฟ้าทั้งสองพื้นที่ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย PGPR สองสายพันธุ์ดังกล่าวต้านทานโรคใบด่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่สุด 1 ฤดูกาล ผลการศึกษาในปีที่สองนั้นพบว่า PGPR mixtures สามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้างกับพืชแตงกวาอย่างน้อยที่สุด 2 พื้นที่และส่วนใหญ่สามารถยับยั้งโรคที่มีอยู่แล้วในพื้นที่ เช่นโรคใบด่าง โรคเหี่ยวเหี่ยว และโรคโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าอย่างมีนัยสำคัญตลอดฤดูกาลปลูกเมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยแบคทีเรีย อีกทั้ง PGPR mixtures ยังช่วยส่งเสริมให้พืชมีผลผลิตเพิ่มขึ้นเช่นกัน สำหรับวัตถุประสงค์ที่สองนั้นผู้วิจัยได้จัดบรรยาย/อภิปรายและศึกษาดูงานแปลงสาธิต PGPR ที่มหาวิทยาลัยนเรศวรให้กับเกษตรกรที่สนใจในด้านการจัดการและการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นเวลา 1 วัน ทำการวัดความรู้และความตระหนักของเกษตรกรทันทีทั้งก่อนและหลังการสัมมนา และวัดความรู้และความตระหนักกับเกษตรกรกลุ่มเดิมภายหลังการสัมมนาเป็นเวลา 6 เดือน จากผลการศึกษาพบว่าการบรรยาย/อภิปรายผลสามารถเพิ่มความรู้ของเกษตรกรอย่างมีนัยสำคัญ และความรู้ส่วนใหญ่ยาวนานถึง 6 เดือน อย่างไรก็ตามการอบรมดังกล่าวยังไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความตระหนักของเกษตรกรได้ ยกเว้นเกษตรกรมีความตระหนักเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเกี่ยวกับอันตรายของสารกำจัดศัตรูพืช จากผลการทดลองพืชทั้ง 4 pathosystems คือ พริกชี้ฟ้า/*Sclerotium rolfsii* มะเขือเทศ/*S. rolfsii* มะเขือเทศ/*Ralstonia solanacearum* และ พริกชี้ฟ้า/*Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าพืชที่กระตุ้นด้วยด้วย PGPR mixtures (IN937a+b) มีกิจกรรมของเอนไซม์ total peroxidase และ total superoxide dismutase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุเมื่อเปรียบเทียบกับพืชกรรมวิธีควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า PGPR mixtures (IN937a+b) สามารถ

กระตุ้นพืชต้านทานต่อโรคหลายชนิดที่มีอยู่แล้วในพื้นที่ของเกษตรกรหลายพื้นที่ อีกทั้งพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ทั้ง 4 pathosystems อย่างน้อยที่สุดสร้างสิ่งป้องกันกันตนเองในช่วงระยะแรกภายหลังการปลูกเชื้อคล้ายกัน 2 ชนิด คือ peroxidase และ superoxide dismutase นอกจากนี้การจัดบรรยาย/อภิปรายและศึกษาดูงานแปลงสาธิต PGPR เพียง 1 วัน สามารถเพิ่มความรู้ให้กับเกษตรกร แต่ควรต้องจัดหลายครั้งเพื่อให้เกษตรกรเกิดความตระหนักในการนำ PGPR ไปใช้ร่วมในการจัดการโรคพืชผัก

Abstract

Previous experiments indicated compatible mixtures of plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains protected plants against multiple diseases during both the rainy and winter seasons. Those results lead to the aims of this research study as following: 1) to conduct on farm investigations the consistency of PGPR-mediated protection against indigenous tropical diseases., 2) to study grower's knowledge and awareness for using PGPR as an integrated disease management, and 3) to investigate early plant defense mechanisms involved with disease resistance. Two consecutive years were studied in grower's fields. In the first study year, experiments were conducted in two locations in Bungphra District, Muang, Phitsanulok. The specific hosts tested were cucumber, pepper, and tomato. In the second year, experiments were performed in one location in Tapho District and two locations in Watprig District, Muang, Phitsanulok. Only two specific hosts, pepper and cucumber, were tested. The results from both locations in the first year study indicated that most cucumber and tomato treated with PGPR mixtures (*Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a + *B. pumilis* strain IN937b) showed significant reductions ($P \leq 0.05$) of mosaic disease and yellow leaf curl disease compared to nonbacterized control. Additionally, PGPR mixtures also showed significant suppression against pepper mosaic disease in both locations at least one season. In the second year study, PGPR mixtures significantly suppressed downy mildew disease in cucumber at least two locations and most other indigenous diseases (mosaic, bacterial wilt, and southern blight) on long cayenne pepper in all locations throughout the seasons compared to those in nonbacterized control. Yield enhancement by PGPR mixtures was also observed. For the second objective, a one-day lecture/discussion and a PGPR field demonstration was conducted at Naresuan University for growers who were interested in disease management and biological control measures. Farmers' knowledge and awareness were examined immediately before and after lecture/discussion and were follow-uped with the same group until 6 months after lecture/discussion. The results indicated that the intervention significantly affected farmers' knowledge. Most knowledge persisted to six months. However, the intervention could not create a significant difference on farmers' awareness, except a minor improvement in the awareness of pesticide harm. For early plant defense mechanism involved with disease resistance, it was found that total peroxidase activity and total superoxide dismutase in plants from all 4 pathosystems; including pepper/*Sclerotium rolfsii*, tomato/*S. rolfsii*, tomato/*Ralstonia solanacearum*, and pepper/*Colletotrichum gloeosporioides*, rapidly increased and had significantly greater activity than plants in non-bacterized challenge control following pathogen infection. In conclusion, compatible PGPR mixtures (IN937a+IN937b) provided broad disease suppression against several indigenous tropical diseases at different locations. Additionally, plants induced by PGPR mixtures (IN937a+b) of all 4 pathosystems at least increased similar early plant defense mechanisms which are peroxidase and superoxide dismutase. Moreover, a one-day lecture/discussion and a PGPR field demonstration could increase knowledge of growers, but the intervention should be practiced several times to improve grower's awareness of using PGPR as an integrated method for vegetable disease management.

Executive Summary

1. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพในประเทศไทยส่วนใหญ่มุ่งเน้นกลไกด้านการเป็นปฏิปักษ์ (Antagonism) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อราเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (Biocontrol agent) ต่อเชื้อสาเหตุโรค อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาน้อยมากเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์จำพวก plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) มากระตุ้นพืชให้สร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรค ซึ่งแนวคิดนี้ได้ดึงดูดความสนใจของนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมากทั้งนี้เพราะแบคทีเรียดังกล่าวนอกจากจะกระตุ้นพืชสร้างภูมิคุ้มโรคได้แล้ว ยังสามารถส่งเสริมพืชมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตมากขึ้นเช่นกัน

จากการศึกษาในแปลงทดลองที่มหาวิทยาลัยนเรศวรช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2544-2545 ที่ผ่านมามีพบว่าพืชแตงกวา มะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR บางสายพันธุ์ที่เข้ากันได้สามารถต้านทานโรคใบด่างซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส Cucumber mosaic virus โรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และโรคกุ้งแห้งหรือแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ตามลำดับได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) อีกทั้งยังส่งเสริมให้พืชมีผลผลิตที่มากกว่าประมาณ 20-30% เมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังพบอีกว่าพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR ร่วมกันนั้นให้ผลในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าและมีผลผลิตที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR เพียงชนิดเดียว

อย่างไรก็ตามปัญหาหลักของการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพในสภาพธรรมชาตินั้นส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับความไม่คงที่ของประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่มีความผันแปรตามสภาพพื้นที่หรือสภาพอากาศ ซึ่งบางครั้งอาจประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคพืชในบางพื้นที่หรือบางฤดูกาล แต่ล้มเหลวในอีกพื้นที่หนึ่งหรืออีกฤดูกาลหนึ่ง ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในวงกว้างเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี ดังนั้นก่อนที่จะนำผลการศึกษาวินิจฉัยไปถ่ายทอดให้เกิดประโยชน์กับเกษตรกรในพื้นที่ต่าง ๆ ได้อย่างแท้จริงนั้นจำเป็นที่จะต้องศึกษาในสภาพพื้นที่ที่มีความแตกต่างทางด้านภูมิศาสตร์เพื่อให้เกิดความแน่ใจก่อนว่าประสิทธิภาพของการต้านทานโรคที่กระตุ้นโดยการให้ PGPR ร่วมกันนั้นมีความคงที่หรือไม่ผันแปรไปตามสภาพพื้นที่ นอกจากนี้ก่อนที่จะนำ PGPR ไปใช้เป็นส่วนหนึ่งในการจัดการโรคพืชของเกษตรกรนั้นควรทำการศึกษาความรู้ และความตระหนักของเกษตรกรในการรับเอาวิธีการนี้เป็นองค์ประกอบร่วมกับระบบการจัดการศัตรูพืชที่มีอยู่เดิมเช่นกัน อีกทั้งการเข้าใจถึงกลไกการป้องกันตนเองของพืชที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR เพื่ออธิบายถึงผลในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาให้เข้าใจอย่างถ่องแท้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาประสิทธิภาพที่คงที่ในการใช้ PGPR ร่วมกันในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคพืชหลายชนิดในสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันเพื่อลดข้อจำกัดของการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในหลายพื้นที่ต่อไปในอนาคต ตลอดจนการศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรที่จะรับเอาวิธีการดังกล่าวมาเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการโรคพืชผักโดยชีววิธีที่พยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี นอกจากนี้ยังศึกษาถึงกลไกที่พืชสร้างสิ่งป้องกันทางด้านชีวเคมีที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคเช่นกัน

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพที่คงที่ของ PGPR ที่เข้ากันได้ในการกระตุ้นพืชสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่มีอยู่แล้วในพื้นที่เกษตรกร
- 2.2 เพื่อศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก
- 2.3 เพื่อศึกษาสิ่งป้องกันตนเองของพืชที่เกิดขึ้นในช่วงระยะแรกซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

3. ระเบียบวิธีวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ 1: เพื่อประเมินประสิทธิภาพที่คงที่ของ PGPR ที่เข้ากันได้ในการกระตุ้นพืชสร้างภูมิคุ้มกันโรคที่มีอยู่แล้วในพื้นที่เกษตรกร

ผู้วิจัยทำการสำรวจพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกที่เป็นแหล่งปลูกผักเพื่อคัดเลือกพื้นที่ก่อนดำเนินการทดลอง โดยพื้นที่ดังกล่าวควรเป็นพื้นที่ราบลุ่มและอยู่ในเขตชลประทานหรือมีแหล่งน้ำเพียงพอตลอดฤดูกาลปลูก อีกทั้งเป็นพื้นที่ซึ่งเคยปลูกแตงกวา พริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศ ที่ประสบปัญหาของโรคใบด่าง โรคแอนแทรคโนส โรคโคนเน่า หรือโรคเหี่ยวเฉามาก่อน

เมื่อคัดเลือกพื้นที่เป็นที่เรียบร้อยแล้วจึงดำเนินการวิจัยในพื้นที่ของเกษตรกร ซึ่งในปีแรกทำการทดลองใน 2 พื้นที่ของเกษตรกร ต. บึงพระ อ.เมือง จ.พิษณุโลก โดยผู้วิจัยได้ชี้แจงรายละเอียดของงานวิจัยให้เกษตรกรได้รับทราบก่อนดำเนินการ และเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งการทดลองทั้งสองพื้นที่ประกอบด้วยพืชทดสอบ 3 ชนิดคือ พริกชี้ฟ้า แตงกวา และมะเขือเทศ พืชแต่ละชนิดมีรูปแบบของการทดลองคือ Randomized complete block (RCB) ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b โดยที่แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

นำเมล็ดพืชกระตุ้นในลักษณะ seed treatment โดยแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียของแต่ละกรรมวิธีที่มีความเข้มข้น 10^{11} cells/ml เป็นเวลา 60 นาที ส่วนกรรมวิธีควบคุมนั้นแช่เมล็ดในอาหารเหลว tryptic soy broth จากนั้นนำเมล็ดไปปลูกในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat ในเรือนทดลอง เมื่อพืชเจริญเติบโตพอสมควรนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^8 cells/ml ราดลงในแต่ละหลุมของถาดเพาะกล้า ส่วนกรรมวิธีควบคุมนั้นราดด้วยสารละลายเจือจาง tryptic soy broth จากนั้นย้ายต้นกล้าลงปลูกในพื้นที่ของเกษตรกร ให้อยู่พืชในระยะเวลาที่กำหนด กำจัดศัตรูพืชเป็นระยะ บันทึกผลการเจริญเติบโตของพืชก่อนเข้าระยะเจริญพันธุ์ บันทึกผลการเกิดโรคและผลผลิตจนกระทั่งเสร็จสิ้นผลการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และแยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

สำหรับการทดลองในปีที่ 2 นั้นผู้วิจัยได้ยื่นขออนุมัติทำการวิจัยต่อคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อได้รับอนุมัติแล้วจึงทำสัญญาความความยินยอมในการทำวิจัยกับเกษตรกรอาสาสมัคร 3 พื้นที่ คือเกษตรกรใน ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 1 พื้นที่ และ เกษตรกรใน ต.วัดพริก อ.เมือง จ.พิษณุโลก 2 พื้นที่ จากนั้นได้เก็บตัวอย่างดินของแต่ละพื้นที่มาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร การทดลองในปีนี้มีพืชทดสอบเพียง 2 ชนิดคือ แตงกวาและพริกชี้ฟ้า รูปแบบการทดลองคือ randomized of treatments ประกอบด้วย 2 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b เนื่องจากในกรรมวิธีควบคุมนั้นเกษตรกรแต่ละพื้นที่สามารถใช้สารกำจัดศัตรูพืชฉีดพ่นได้ตามประสบการณ์ของตัวเองจึงต้องแยกแปลงทดลองของกรรมวิธีทั้งสองให้ห่างกันพอสมควรเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารเคมีจากแปลงทดลองในกรรมวิธีควบคุมไปยังแปลงทดลองในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR วิธีการดำเนินการวิจัยในปีนี้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับที่ได้กล่าวไว้ในปีแรก นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Independent Sample t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

วัตถุประสงค์ที่ 2: เพื่อศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก

ผู้วิจัยจัดการอบรมอาสาสมัครเกษตรกรเกี่ยวกับแนวคิดการกระตุ้นให้พืชต้านทานโรคและข้อดีของการใช้ PGPR เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี ซึ่งลักษณะการอบรมประกอบด้วย การบรรยาย การอภิปราย การสาธิตและการดูงานด้านการใช้ PGPR ในเรือนเพาะชำที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นเวลา 1 วัน มีการวัดความรู้และความตระหนักของเกษตรกรก่อนและหลังการอบรมทันที ภายหลังการอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือนตามลำดับเพื่อศึกษาความคงทนและการเปลี่ยนแปลงของความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผักเมื่อเวลาผ่านไป

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย คือ แบบเก็บข้อมูลที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น อันประกอบด้วยชุดคำถามเพื่อวัดความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก ทำการประเมินคุณภาพของแบบเก็บข้อมูลทั้งในแง่ความเที่ยงและความตรงก่อนนำเครื่องมือไปใช้ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดค่านัยสำคัญที่ .05

วัตถุประสงค์ที่ 3: เพื่อศึกษาสิ่งป้องกันตนเองของพืชที่เกิดขึ้นในช่วงระยะแรกซึ่งเกี่ยวข้องกับทางด้านทานโรค

การศึกษากลไกการป้องกันตนเองนี้ได้ทำการศึกษาในสภาพเรือนทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 pathosystems ดังนี้ มะเขือเทศ/เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* มะเขือเทศ/เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พริกชี้ฟ้า/เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ พริกชี้ฟ้า/เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยทำการทดลองแต่ละ pathosystem อย่างน้อย 2 ครั้ง

รูปแบบการทดลองในแต่ละ pathosystem คือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (IN937a+IN937b) แต่ละกรรมวิธีมีอย่างน้อยที่สุด 5 ซ้ำ สำหรับ factor ของการทดลองคือระยะเวลาการเก็บตัวอย่างก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ทำการบันทึกผลการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธีทุกครั้งก่อนเก็บตัวอย่างพืช จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลองในแต่ละ pathosystem นำตัวอย่างพืชเก็บแช่ไว้ในตู้แช่ (-20°C) เพื่อรอการวิเคราะห์เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช เช่น เอ็นไซม์ peroxidase และเอ็นไซม์ superoxide dismutase วิเคราะห์ข้อมูลการเกิดโรคในแต่ละ pathosystem โดยใช้ ANOVA และใช้ least significant difference ($P \leq 0.05$) แยกความแตกต่างค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคและค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอ็นไซม์ในแต่ละกรรมวิธี

4. เนื้อหางานวิจัย

4.1 การประเมินประสิทธิภาพของ PGPR ในพื้นที่ต่าง ๆ ของเกษตรกร

ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ศึกษาข้อมูลทุติยภูมิเกี่ยวกับพื้นที่ปลูกผักของจังหวัดพิษณุโลกจากสำนักงานเกษตรจังหวัดพิษณุโลก และได้ดำเนินการสำรวจพื้นที่ปลูกผักเพื่อพิจารณากำหนดพื้นที่เป้าหมายโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาดังนี้

1. พื้นที่เป้าหมายต้องเป็นพื้นที่ซึ่งมีการปลูกผักเป็นอาชีพหลัก
2. พื้นที่เป้าหมายต้องมีแหล่งน้ำที่สามารถใช้ได้ระยะเวลาทำการทดลองวิจัย
3. พื้นที่เป้าหมายต้องเป็นพื้นที่ที่เกษตรกรมีพื้นที่เป็นของตนเอง

4. พื้นที่เป้าหมายประสบปัญหาโรคพืช เช่น โรคใบด่าง โรคแอนแทรคโนส โรคโคนเน่า หรือ โรคเหี่ยวเฉียว
5. เกษตรกรซึ่งเป็นเจ้าของพื้นที่ให้ความร่วมมือปฏิบัติตามที่ตกลงไว้กับผู้วิจัย

4.1.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีบางประการของดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ของเกษตรกร แล้วนำดินที่ได้มาผึ่งให้แห้งในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งดินแห้งสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการทางด้านกายภาพและเคมีที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

4.1.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ชนิด *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a และ ชนิด *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b จากห้องปฏิบัติการทางด้านแบคทีเรียของศาสตราจารย์ ดร. โจเซฟ คลอปเปอร์ มหาวิทยาลัยออเบิร์น รัฐอะลาบามา ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ถูกบรรจุไว้ใน cryovial ขนาด 1.5 ml ที่มีอาหารเหลว TSB ซึ่งมีส่วนผสม 20% glycerol แล้วเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง (-80°C) เป็นเวลานานเพื่อรอการทดลองต่อไป

เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียในการทดลองใช้ห้วงเวลาที่ฆ่าเชื้อแล้วชุดเอาแบคทีเรียที่อยู่ในภาวะเยือกแข็งใน cryovial มาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารเหลว TSB ปริมาตร 100 ml แล้วบ่มเชื้อในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 30°C ที่มีความเร็ว 100 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 10^{11} cells/ml สำหรับแช่เมล็ด (seed treatment) หรือ 10^8 cells/ml สำหรับใช้ราดรากพืช (soil drench)

4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในแปลงเกษตรกรปีแรก

ผู้วิจัยทำการทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในพื้นที่เกษตรกร 2 พื้นที่ ในที่นี้สมมุติเป็นพื้นที่ A และพื้นที่ B อยู่ที่ตำบลบึงพระ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2546 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2547) และฤดูฝน (เดือนมิถุนายน 2547 ถึง เดือนกันยายน 2547) โดยพื้นที่ดังกล่าวห่างจากมหาวิทยาลัยนเรศวรประมาณ 15 กิโลเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกแตงกวา มะเขือเทศพริกชี้ฟ้า กวางตุ้ง คะน้า และผักอื่นๆ จากการสัมภาษณ์เกษตรกรก่อนเริ่มดำเนินการทดลองพบว่าเกษตรกรเคยปลูกมะเขือเทศและประสบปัญหาโรคใบม้วนเหลืองทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากถึงขั้นเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้ในช่วงปลายฤดูกาลปลูก เป็นเหตุให้เกษตรกรเลิกการปลูกมะเขือเทศในพื้นที่ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโรคใบด่างเป็นโรคที่สำคัญของแตงกวา สำหรับพริกชี้ฟ้าพื้นที่นั้นมีโรค 2 ชนิดที่สำคัญคือ โรคแอนแทรคโนส

โนสและโรคใบด่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาลปลูก อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้โรคใบด่างกลายเป็นโรคที่สำคัญของพริกชี้ฟ้าในพื้นที่นั้น

แต่ละพื้นที่มีพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ แตงกวา (*Cucumis sativus* L) สายพันธุ์ทองพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh) สายพันธุ์ชัยภูษา 111 และมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) สายพันธุ์สีดา โดยที่แต่ละพืชมีรูปแบบการทดลองคือ randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ IN937b ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ หน่วยการทดลองคือแปลงทดลองที่มีความกว้าง 1 เมตร และความยาว 10 เมตร พืชแต่ละต้นมีระยะห่างประมาณ 50 เซนติเมตร (1 แปลงมี 18 ต้น) แต่ละแปลงมีพลาสติกคลุมแปลงสีบรอนซ์เพื่อควบคุมความชื้น กำจัดวัชพืชเป็นระยะโดยใช้มือถอนและ/หรือเครื่องตัดหญ้า และให้น้ำกับพืชทุกวัน

แช่เมล็ดพืชในสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 ml (ความเข้มข้น 10^{11} cells/ml) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml และนำไปต้มไว้ในตู้บ่มเพาะความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C นาน 60 นาที จากนั้นนำเมล็ดปลูกในถาดเพาะกล้าพลาสติกที่บรรจุ soilless peat สำหรับเมล็ดในกรรมวิธีควบคุมนั้นแช่ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) เพาะต้นกล้าทั้งหมดในเรือนทดลอง ราดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 10 ml (ความเข้มข้น 10^8 cells/ml) ลงในแต่ละหลุมของต้นกล้าแตงกวาที่มีอายุ 5 วัน และแต่ละหลุมของต้นกล้ามะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ในขณะที่ราดสารละลาย TSB ที่เจือจาง (1 ml TSB ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1,000 ml) ปริมาตร 10 ml ลงในแต่ละหลุมของต้นกล้าแตงกวาและมะเขือเทศของกรรมวิธีควบคุม ย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรทั้งสองพื้นที่ภายหลังการราดสารแขวนลอยแบคทีเรีย/สารเจือจาง TSB แล้ว 7 วัน ฉีดพ่นปุ๋ยน้ำ (16-20-0) ให้พืชทันทีภายหลังย้ายกล้าลงแปลงแล้วและฉีดพ่นอีกครั้งใน 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดพ่นปุ๋ยน้ำ (7-13-21) เมื่อพืชเริ่มติดดอกและฉีดพ่นอีกครั้งใน 2 สัปดาห์ต่อมา ใช้ไม้ที่มีความยาวประมาณ 2 เมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว) ปักเป็นหลักให้พืชแตงกวาแต่ละต้น ส่วนไม้ที่มีความยาวประมาณ 1.5 เมตรใช้เป็นหลักให้กับพืชมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้า ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิดเมทาไมโดฟอสหนึ่งหรือสองครั้งในช่วงระยะการเจริญเติบโตของพืชซึ่งเป็นระยะก่อนการเจริญพันธุ์เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของแมลงศัตรูพืช

สังเกตการเกิดโรคที่เกิดตามธรรมชาติกับพืชทดสอบทุกสัปดาห์ บันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบด่างของแตงกวาภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง 35 วัน บันทึกความรุนแรงของโรคใบม้วนเหลืองของมะเขือเทศและจำนวนต้นที่แสดงอาการใบด่างของพริกชี้ฟ้าภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง 60 วัน วัดการเจริญเติบโตของพืชแตงกวา มะเขือเทศ และพริกชี้ฟ้าภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง 1 เดือน เก็บเกี่ยวผลผลิตพืชแต่ละชนิดตั้งแต่เริ่มเก็บจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาล นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance

(ANOVA) และแยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ส่งใบอ่อนของพืชแต่ละชนิดที่แสดงอาการดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นไปวิเคราะห์ชนิดของเชื้อสาเหตุโรคที่หน่วยพันธุวิศวกรรมพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *Tomato Yellow leaf curl virus* ในพืชมะเขือเทศและพริกชี้ฟ้า และใช้เทคนิค Reverse Transcriptase-PCR สำหรับวิเคราะห์ *Cucumber Mosaic Virus* ในพืชแตงกวา

4.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในแปลงเกษตรกรปีที่สอง

ผู้วิจัยได้ยื่นขออนุมัติดำเนินการวิจัยกับคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ ของมหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งการยื่นขออนุมัติในการทำวิจัยในครั้งนี้ มีเอกสารหลักประกอบการขออนุมัติดังนี้ แบบเสนอเพื่อขอรับการพิจารณาจริยธรรม คำชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย หนังสือแสดงความยินยอมจากอาสาสมัครโดยได้รับคำบอกกล่าวและเต็มใจ ประวัติส่วนตัวของผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัยทุกคนและระเบียบขั้นตอนการดำเนินการวิจัย และหนังสืออนุญาตจากต้นสังกัดของผู้ร่วมวิจัย (เอกสารการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยในมนุษย์ อยู่ในภาคผนวก)

ช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2548) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR อีก 3 พื้นที่ ซึ่งในที่นี้ขอสมมุติเป็นพื้นที่ C และพื้นที่ D อยู่ที่ตำบลวัดพริก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และพื้นที่ E อยู่ที่ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก อย่างไรก็ตามเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ขอถอนตัวการเข้าร่วมโครงการวิจัยในช่วงฤดูฝน (เดือนมิถุนายน ถึง เดือน กันยายน 2548) เนื่องจากเหตุผลส่วนตัว จึงเหลือเพียง 2 พื้นที่คือ พื้นที่ C และพื้นที่ E ในฤดูกาลนี้

พื้นที่ C และ พื้นที่ D ห่างจากมหาวิทยาลัยนเรศวรประมาณ 20 กิโลเมตร ในขณะที่พื้นที่ E ห่างจากมหาวิทยาลัยนเรศวร 2 กิโลเมตร พื้นที่ทั้งสามปลูกแตงกวาและพริกชี้ฟ้าเป็นพืชหลัก โรคราน้ำค้างเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับแตงกวาทุกฤดูกาลปลูก ส่วนโรคใบด่างเป็นโรคที่สำคัญของพริกชี้ฟ้าในพื้นที่ C และ พื้นที่ E ซึ่งโรคเหี่ยวเฉาที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และโรคโคนเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เป็นโรครองร่วมกันกับโรคใบด่างในพื้นที่ C และ พื้นที่ E ตามลำดับ ในขณะที่โรคเหี่ยวเฉาเท่านั้นที่เป็นโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายกับพริกชี้ฟ้าในพื้นที่ D ทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้เล็กน้อยหรือแทบไม่ได้เลย

เนื่องจากผลการทดลองในปีแรกพบว่า พืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b ให้ผลที่คงที่ในการต้านทานต่อโรคที่เกิดในสภาพธรรมชาติมากกว่าพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว ดังนั้นจึงถูกเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพของ PGPR ในปีนี้ สำหรับในปีนี้มีเพียงพืชทดสอบ 2 ชนิดคือ

พริกชี้ฟ้าและแตงกวา รูปแบบการทดลองคือ Randomized of Treatments ประกอบด้วยกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย PGPR (เกษตรกรแต่ละรายสามารถใช้สารกำจัดศัตรูพืชและปุ๋ยเคมีได้ตามประสบการณ์ของแต่ละคน) และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b (ผู้วิจัยควบคุมการให้ปุ๋ยและสารฆ่าแมลง แต่ไม่มีการใช้สารกำจัดโรคพืช) แยกแปลงทดลองของกรรมวิธีควบคุมห่างจากแปลงทดลองของกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR เพื่อป้องกันการแปดเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชจากแปลงควบคุมปลิวมายังแปลงที่กระตุ้นด้วย PGPR ข้างของแต่ละกรรมวิธีคือแปลงทดลองขนาดกว้าง 1 เมตร (ความยาวต่างกันในแต่ละพื้นที่เนื่องจากมีพื้นที่การทดลองไม่เท่ากัน) แต่ละแปลงทดลองมีระยะห่างระหว่างแปลง 1 เมตร ซึ่งพืชที่ปลูกในแต่ละแปลงมีระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร กำจัดวัชพืชเป็นระยะโดยใช้เครื่องมือการเกษตรหรือโดยใช่มือ และให้น้ำกับพืชทุกวัน

แช่เมล็ดพืชในสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาณ 100 ml (ความเข้มข้น 10^{11} cells/ml) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ส่วนเมล็ดพืชในกรรมวิธีควบคุมนั้นแช่ในอาหารเหลว TSB โดยดำเนินการด้วยวิธีเดียวกันกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น นำเมล็ดพืชปลูกในถาดเพาะกล้าที่บรรจุ soilless peat และวางไว้ในเรือนทดลอง รดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาณ 10 ml (ความเข้มข้น 10^8 cells/ml) ลงในแต่ละหลุมของต้นกล้าแตงกวาที่มีอายุ 5 วัน และแต่ละหลุมของต้นกล้าพริกชี้ฟ้าที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ในขณะที่รดสารละลาย TSB ที่เจือจาง ย้ายต้นกล้าลงปลูกในแปลงเกษตรกรภายหลังการรดสารแขวนลอย/สารละลายเจือจาง TSB แล้ว 7 วัน

ให้ปุ๋ยเคมี (16-20-0 และ 7-13-21) กับพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR เช่นเดียวกับการทดลองในปีแรก ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงเมทามิโดฟอส และ/หรือ *Bacillus thuringiensis* ให้กับพืชในช่วงระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น ส่วนแปลงทดลองในกรรมวิธีควบคุมนั้นเกษตรกรอาสาสมัครแต่ละพื้นที่ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตามประสบการณ์ของตนเอง รวมถึงการให้ปุ๋ยเคมีและฮอร์โมนที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เกษตรกรรายงานการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ปุ๋ยเคมี และฮอร์โมนให้กับผู้วิจัยทุกสัปดาห์

บันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการโรคใบด่าง โรคเหี่ยวเฉียว และโรคโคนเน่า ในพื้นที่ปลูกพริกทุกสัปดาห์ภายหลังการย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูก โดยทั่วไปแล้วโรคแต่ละชนิดที่กล่าวข้างต้นซึ่งปรากฏกับพริกชี้ฟ้าแสดงลักษณะอาการที่เด่นชัดออกมาทำให้ง่ายต่อการบันทึกชนิดอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับพริกชี้ฟ้า สำหรับโรคราน้ำค้างที่ปรากฏกับแตงกวานั้นบันทึกในลักษณะความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในแต่ละแปลง ซึ่งในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2548) นั้นได้บันทึกความรุนแรงของโรคราน้ำค้างหนึ่งครั้งโดยการเดินตรวจสอบอาการของโรคตลอดความยาวของแต่ละแปลงทดลอง ความรุนแรงของโรคราน้ำค้างแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้ 0=ไม่ปรากฏโรคราน้ำค้าง 1=เกิดโรค 10% ของต้นพืชในแปลงทดลอง 2=เกิดโรค 25% ของต้นพืชในแปลงทดลอง 3=เกิดโรค 50% ของต้นพืชในแปลงทดลอง 4=เกิดโรค 75% ของต้นพืชในแปลงทดลอง 5=ต้นพืชแสดงอาการโรคราน้ำค้าง 100% ทั่วทั้งต้นพืชตลอดแปลงทดลอง โดยที่เปอร์เซ็นต์ที่เกิดขึ้นนั้นดูจาก

สัดส่วนของโรคที่ปรากฏในต้นพืช หากปรากฏ 100% นั้นหมายถึงโรคราน้ำค้างปรากฏทั่วทั้งต้นพืช สำหรับการบันทึกความรุนแรงของโรคราน้ำค้างในช่วงฤดูฝน (เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน 2548) นั้นได้บันทึกผลอย่างน้อยที่สุด 5 ครั้งตลอดความยาวของแปลงทดลองแต่ละแปลง นำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Independent Sample *t*-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ผลผลิตรวมของพืชในแต่ละกรรมวิธีได้จากการที่เกษตรกรเก็บจากแต่ละแปลง (ซ้ำของการทดลอง) เอมารวมกันโดยมิได้แยกว่ามาจากแปลงไหนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ได้

ส่งใบอ่อนของพริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการโรคใบด่างไปวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคที่หน่วยพันธุวิศวกรรมพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *Tomato Yellow leaf curl virus*

4.2 การศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก

ผู้วิจัยได้เล็งเห็นว่าการนำ PGPR ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อทางด้านเกษตรในอนาคตนั้นจำเป็นต้องมีการเผยแพร่ความรู้ที่ถูกต้องเกี่ยวกับ PGPR และความปลอดภัยของ PGPR ต่อสิ่งแวดล้อมให้กับเกษตรกรได้เข้าใจถึงหลักการและประโยชน์ที่จะได้รับก่อนที่จะนำไปใช้ในพื้นที่ของเกษตรกร

วัตถุประสงค์ของการจัดอบรมสัมมนาเพื่อ

1. เผยแพร่ความรู้และประโยชน์ของ PGPR ที่มีต่อการเกษตร
2. เสนอทางเลือกใหม่ให้กับเกษตรกรในการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมสำหรับการจัดการโรคพืชผัก
3. สร้างความตระหนักให้กับเกษตรกรเกี่ยวกับการผลิตพืชที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

จำนวนผู้ที่เข้าร่วมโครงการเป็นเกษตรกรที่มีความสนใจจำนวน 37 ราย โดยจัดอบรมสัมมนาในวันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547 รูปแบบการอบรมสัมมนาประกอบด้วยบรรยายเกี่ยวกับ PGPR และการจัดการโรคพืชด้วยวิธีการต่างๆในช่วงเช้า และการศึกษาดูงานในแปลงทดลอง PGPR ในช่วงบ่าย วัดผลโดยการทดสอบความรู้ ทักษะ ความเชื่อ และพฤติกรรมการกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรก่อนและหลังการอบรม หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ติดตามเกษตรกรกลุ่มเดิมเพื่อวัดวัดความรู้และความตระหนักของเกษตรกรภายหลังการอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ เพื่อศึกษาความคงทนและการเปลี่ยนแปลงของความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผักเมื่อ

เวลาผ่านไป เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย คือ แบบเก็บข้อมูลที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น อันประกอบด้วยชุดคำถามเพื่อวัดความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผัก ทำการประเมินคุณภาพของแบบเก็บข้อมูลทั้งในแง่ความเที่ยงและความตรงก่อนนำเครื่องมือไปใช้ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ กำหนดค่านัยสำคัญที่ .05

4.3 สิ่งป้องกันในแต่ pathosystem ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

4.3.1 การกระตุ้นพืชโดยวิธี seed treatment และ soil drench กับพืชทดสอบ

นำเชื้อ PGPR สายพันธุ์ IN937a และ สายพันธุ์ IN937b ที่อยู่ภาวะเยื่อแข็งออกจากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C มาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารเหลว TSB 100 ml บ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ $28-30^{\circ}\text{C}$ ความเร็ว 100 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง แช่เมล็ดพืชในสารแขวนลอย PGPR mixtures (ความเข้มข้น 10^{11} cells/ml) นาน 60 นาที สำหรับกรรมวิธีควบคุมนั้นแช่เมล็ดพืชในอาหารเหลว TSB นาน 60 นาที

ปลูกเมล็ดพืชลงในถาดเพาะกล้าพลาสติกที่บรรจุ soilless peat ย้ายต้นกล้าที่มีอายุ 7 วันลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้วที่บรรจุ soilless peat รวดสารแขวนลอย PGPR mixtures (ความเข้มข้น 10^8 cells/ml) ปริมาตร 50 ml ต่อกระถาง เมื่อพืชมีอายุ 14 วัน ในขณะที่พืชในกลุ่มควบคุมรดสารละลายเชื้อจาก TSB (อาหารเหลว TSB 1 ml/น้ำกลั่น 1,000 ml) ในปริมาณเท่ากัน เมื่อพืชเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่งจึงทำการปลูกเชื้อทดสอบในแต่ละ pathosystem

4.3.2 pathosystem ระหว่างเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ พริกชี้ฟ้า/มะเขือเทศ

พันธุ์พืชที่ใช้ทำการทดลองคือ พริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh) สายพันธุ์ชัญญา 111 และมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) สายพันธุ์สีดา โดยทำการทดลองในสภาพเรือนทดลองและแยกทำการทดลองแต่ละพืช ซึ่งแต่ละพืชมีรูปแบบการทดลองคือ 3X6 Factorial with Randomized Complete Block ประกอบด้วยกรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (IN937a+IN937b) แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ หน่วยการทดลองคือต้นพืชแต่ละต้น ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง สำหรับปัจจัยของการทดลองคือระยะเวลาเก็บตัวอย่างพืช 0 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 36 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ และวันบันทึกผลการเกิดโรคคือ 144 ชั่วโมง

เมื่อพืชอายุได้ 1 เดือนเริ่มเก็บตัวอย่างพืชมะเขือเทศ/พริกชี้ฟ้าบางต้นในแต่ละกรรมวิธี ก่อนการปลูกเชื้อให้กับต้นที่เหลือ ซึ่งตัวอย่างที่เก็บได้นี้ถือเป็น 0 ชั่วโมงของการปลูกเชื้อ โดยใช้มีดตัดลำต้นที่อยู่เหนือดินประมาณ 1 เซนติเมตร โดยมีตัวอย่างขนาดยาวประมาณ 3

เซนติเมตรแล้วนำตัวอย่างพืชเก็บแช่ไว้ในตู้แช่ (-20°C) ก่อนปลูกเชื้อ *S. rolfsii* ให้กับต้นที่เหลือ

สำหรับการปลูกเชื้อโรคให้กับพืชในกรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures นั้นใช้มีดผ่าตัดตัดอาหารวัน PDA ที่มีเชื้อ *S. rolfsii* อายุ 4-5 วัน เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5 ซม.X1.5 ซม. นำแต่ละชิ้นวางชิดกับโคนต้นมะเขือเทศ/พริกชี้ฟ้าแต่ละต้น ใช้เข็มหมุดยาว 2.5 ซม. ตีรูอาหารวันให้ยึดติด soilless peat บันทึกผลอาการโรคโคนเน่าทุกวันภายหลังการปลูกเชื้อจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง การเก็บตัวอย่างพืชภายหลังการปลูกเชื่อนั้นเก็บจากลำต้นพืชที่อยู่เหนือบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย 1 เซนติเมตรโดยมีขนาดของตัวอย่างยาวประมาณ 3 เซนติเมตร นำตัวอย่างพืชไปแช่ไว้ในตู้แช่ (-20°C) เพื่อรอการวิเคราะห์เอ็นไอเอ็มต่อไป นำข้อมูลการเกิดโรคไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

4.3.3 pathosystem ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และมะเขือเทศ

พันธุ์พืชที่ใช้ทำการทดลองคือ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) สายพันธุ์สีดา ทำการทดลองในสภาพเรือนทดลอง รูปแบบการทดลองคือ 3X5 Factorial with Randomized Complete Block ประกอบด้วย กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (IN937a+IN937b) แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ หน่วยการทดลองคือต้นพืช สำหรับปัจจัยของการทดลองคือระยะเวลาเก็บตัวอย่างพืชซึ่งรวมถึงวันก่อนปลูกเชื้อ (0 วัน) และวันหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน 4 วัน 7 วัน และ 10 วัน ตามลำดับ บันทึกผลอาการเหี่ยวของมะเขือเทศทุกวันจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

เมื่อพืชอายุได้ 1 เดือนเริ่มเก็บตัวอย่างพืชมะเขือเทศ/พริกชี้ฟ้าบางต้นในแต่ละกรรมวิธีก่อนการปลูกเชื้อให้กับต้นที่เหลือ ซึ่งตัวอย่างที่เก็บได้นี้ถือเป็น 0 วันของการปลูกเชื้อ โดยใช้มีดผ่าตัดลำต้นที่อยู่เหนือดินประมาณ 1 เซนติเมตร และตัดสูงขึ้นไปประมาณ 3 เซนติเมตรแล้วนำตัวอย่างพืชเก็บแช่ไว้ในตู้แช่ (-20°C) ก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ให้กับต้นที่เหลือ

สำหรับวิธีการปลูกเชื้อให้กับพืชในกรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ทำโดยใช้มีดแทงลงไป soilless peat ที่ห่างจากลำต้นมะเขือเทศประมาณ 5 เซนติเมตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เกิดบาดแผลบริเวณรากของมะเขือเทศ ก่อนราดสารแขวนลอย *R. solanacearum* ที่มีความเข้มข้น 10^8 cells/ml ปริมาตร 50 ml ต่อกระถาง บันทึกอาการโรคเหี่ยวเฉาของต้นพืชก่อนเก็บตัวอย่างพืชในแต่ละครั้งภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว 1 วัน 4 วัน 7 วัน และ 10 วัน ตามลำดับ การเก็บตัวอย่างพืชภายหลังการปลูกเชื่อนั้นเก็บจากลำต้นพืชที่อยู่เหนือดินประมาณ 1 เซนติเมตรโดยมีขนาดของตัวอย่างยาวประมาณ 3 เซนติเมตร นำตัวอย่างพืชไปแช่ไว้ในตู้แช่ (-20°C) เพื่อรอการวิเคราะห์เอ็นไอเอ็มต่อไป นำข้อมูลการเกิดโรคไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

4.3.4 pathosystem ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และพริกชี้ฟ้า

พันธุ์พืชที่ใช้ทำการทดลองคือ พริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh) สายพันธุ์สัญญา 111 ทำการทดลองในสภาพเรือนทดลอง รูปแบบการทดลองคือ 3X6 Factorial with Randomized Complete Block ประกอบด้วย กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (IN937a+IN937b) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ หน่วยการทดลองคือต้นพืช สำหรับปัจจัยของการทดลองคือระยะเวลาเก็บตัวอย่างพืชซึ่งรวมถึงวันก่อนปลูกเชื้อ (0 วัน) และวันหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน 4 วัน 7 วัน 10 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ ให้ปุ๋ย (16-12-0) กับพืชเมื่อพืชมีอายุ 40 วัน และให้ปุ๋ย (7-13-21) กับพืชเมื่อพืชมีอายุ 60 วัน และ 75 วันตามลำดับ บันทึกผลความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสทุกวันภายหลังการปลูกเชื้อจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

เริ่มเก็บตัวอย่างของผลพริกชี้ฟ้าบางต้นในแต่ละกรรมวิธีก่อนการปลูกเชื้อให้กับต้นที่เหลือเมื่อผลพริกชี้ฟ้าพัฒนาเต็มที่แล้ว ซึ่งตัวอย่างที่เก็บได้นี้ถือเป็น 0 วันของการปลูกเชื้อโดยเก็บผลพริกชี้ฟ้าออกมาจากต้นจำนวน 2 ผลต่อต้นแล้วใช้มีดตัดเฉพาะบริเวณผิวของผลพริก ที่งอและเยื่อที่อยู่ใจกลางผลพริก นำตัวอย่างไปเก็บในตู้แช่ (-20°C) ย้ายต้นพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ที่เหลือใส่เข้าไปในตู้ทึบแสงที่เก็บความชื้นสัมพัทธ์ได้ประมาณ 85-90% ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. ที่มีส่วนผสมของ 0.1% tween 20 เพื่อลดแรงตึงผิว) ให้ทั่วผลพริกชี้ฟ้าทุกผลจนกระทั่ง run-off แล้วปิดตู้ทึบแสงให้มีมืดสนิทเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแง้มตู้ทึบแสงเล็กน้อยเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ความชื้นภายในตู้ลดลงทีละน้อยจนเท่ากับความชื้นภายนอกตู้แล้วจึงย้ายต้นพืชออกมา บันทึกผลการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าก่อนเก็บตัวอย่างพืชในแต่ละครั้งภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว 1 วัน 4 วัน 7 วัน 10 วัน และ 14 วันตามลำดับ ในกรณีที่ผลพริกชี้ฟ้าแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อภายหลังการติดเชื้อแล้วการเก็บตัวอย่างพืชจะเก็บเฉพาะส่วนที่อยู่ถัดจากบริเวณที่ติดเชื้อออกไปประมาณ 1 เซนติเมตร นำตัวอย่างพืชไปเก็บไว้ในตู้แช่ (-20°C) เพื่อรอการวิเคราะห์เอ็นไซม์ต่อไป นำข้อมูลการเกิดโรคไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างพืช

วัดปริมาณโปรตีนรวมของตัวอย่างพืชที่เก็บได้โดยใช้วิธี Bradford (1976) โดยใส่ Bradford reagent ปริมาตร 990-995 μ l ใน disposable cuvette ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่สารสกัดโปรตีนของพืชตัวอย่างปริมาตร 5-10 μ l เพื่อทำปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm ปริมาณโปรตีนตัวอย่างแสดงค่าเทียบเท่าไมโครกรัมของ bovine serum albumin (BSA) ต่อปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ทำปฏิกิริยา โดยนำไปเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของ BSA

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Total Peroxidase

วัดกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase โดยใช้ guaiacol เป็นตัวให้ไฮโดรเจน ส่วนผสมสารละลายที่ทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 970-990 μl ของ 0.25% (v/v) guaiacol และ 0.1M H_2O_2 ใน 0.01 sodium phosphate buffer (pH 6.0) โดยใส่ใน disposable cuvette ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่เอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชลงไปใน cuvette ประมาณ 10-30 μl ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชเพื่อเริ่มปฏิกิริยา แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm วัดกิจกรรมของเอนไซม์วัดโดยการเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสงที่ 470 nm/นาที่/mg. protein

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Total Superoxide Dismutase (Total SOD)

วัดกิจกรรมของ total SOD โดยใช้วิธีการของ Beachamp และ Fridovich ที่ดัดแปลงจาก Dhindsa และคณะ ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของเอนไซม์ในการยับยั้งการรีดิวซ์ที่ทางด้านเคมีแสงของ nitro blue tetrazolium ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 50mM phosphate buffer (pH 7.8), 0.1mM EDTA, 13mM methionine, 75 μM nitroblue tetrazolium, 2 μM riboflavin, และสารสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างพืช โดยมีปริมาตรรวม 1 ml ใส่ส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดแก้วขนาด 13X1000 มม. โดยใส่ riboflavin เป็นลำดับสุดท้าย นำหลอดแก้วไปปั่นให้ส่วนผสมเข้ากันโดยใช้ vortex mixture และเริ่มปฏิกิริยาโดยการวางหลอดแก้วภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 2 หลอดขนาด 15 วัตต์เป็นเวลา 10 นาที สำหรับหลอดแก้วที่ไม่ได้ให้แสงจะใช้เป็น blank นำหลอดแก้วปั่นอีกครั้งก่อนเทสารละลายลงใน disposable cuvette เพื่อนำไปวัดใน spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm ปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างพืชที่เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อการยับยั้งปฏิกิริยา 50% ถือว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit

5. ผลการทดลอง

5.1 คุณสมบัติของดินทางด้านเคมีและฟิสิกส์

พื้นที่ A B C และ D มีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (silt loam) ในขณะที่พื้นที่ E มีเนื้อดินเป็นดินร่วน (silt) ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินของทั้ง 5 พื้นที่มีความแตกต่างกันไปตั้งแต่ 4.11 ถึง 1.06 พื้นที่ A และ B มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดมากกว่าพื้นที่ C D และ E ประมาณ 10 เท่า พื้นที่ E มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่นๆ และมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มากกว่าพื้นที่ D 10 เท่า มากกว่าพื้นที่ B 3 เท่า และมากกว่าพื้นที่ A และ C 2 เท่า สำหรับปริมาณโปแตสเซียมที่เป็นประโยชน์ในแต่ละพื้นที่นั้นมีความแตกต่างกันซึ่งมีตั้งแต่ 44.52 ถึง 21.21 ppm ความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันตั้งแต่ดินที่มีความเป็นกรดปานกลางในพื้นที่ B มีความเป็นกรดอ่อน

ในพื้นที่ C และ D มีความเป็นกลางในพื้นที่ A จนถึงมีความเป็นด่างอ่อนในพื้นที่ E (ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

5.2 ประสิทธิภาพของ PGPR ในแปลงเกษตรกรปีแรกของการศึกษา

5.2.1 โรคใบด่างของแตงกวา

ผลการทดลองในช่วงฤดูหนาวปี พ.ศ. 2546 พบว่าโรคใบด่างเริ่มปรากฏบนใบอ่อนของแตงกวาภายหลังพืชติดดอกแล้ว 2 สัปดาห์ ต้นพืชที่อ่อนแอมีพัฒนาการของการติดเชื้อทั่วทั้งต้นอย่างรวดเร็ว ในพื้นที่ A นั้น แตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b และแตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียวเกิดโรคน้อยกว่าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 21% และ 17% ตามลำดับ แตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR ทั้งสองกรรมวิธีให้ผลในการต้านทานโรคใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม แตงกวาทุกต้นของทุกกรรมวิธีในพื้นที่ B แสดงอาการใบด่าง สำหรับผลการทดลองในช่วงฤดูฝนปี พ.ศ. 2547 พบว่าใบอ่อนแตงกวาเริ่มแสดงอาการใบด่างภายหลังการย้ายกล้าลงแปลงแล้ว 1 เดือนซึ่งอาการใบด่างเกิดช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในฤดูกาลที่ผ่านมา แตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR สองสายพันธุ์ให้ผลในการเกิดโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ อย่างน้อยที่สุดประมาณ 30% ทั้งสองพื้นที่เมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม สำหรับแตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN8937a อย่างเดียวนั้นโดยทั่วไปเกิดโรคน้อยกว่าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม แต่การเกิดโรคที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญนั้นพบในพื้นที่ B เท่านั้น (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของดินบางประการในพื้นที่ A B C D และ E ของเกษตรกรที่เข้าร่วมในโครงการวิจัย

คุณสมบัติของดิน	พื้นที่ A ค่าบดบึงพระ	พื้นที่ B ค่าบดบึงพระ	พื้นที่ C ค่าบดบึงพระ	พื้นที่ D ค่าบดบึงพระ	พื้นที่ E ค่าบดบึงพระ
ความเป็นกรด-ด่าง	6.95	5.68	6.57	6.32	7.5
ปริมาณอินทรีย์วัตถุ	4.11	2.50	2.56	1.88	1.06
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	0.16	0.13	0.009	0.013	0.013
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (ppm)	7.80	4.04	7.33	0.73	13.01
โปรแตสเซียมที่เป็นประโยชน์(ppm)	36.02	21.21	44.52	26.68	28.36
ลักษณะเนื้อดิน (%sand:%silt:%clay)	ดินร่วนปนทราย (26.8/56.88/54.88)	ดินร่วนปนทราย (24.80/54.88/20.32)	ดินร่วนปนทราย (24.8/55.84/19.36)	ดินร่วนปนทราย (24.8/53.84/21.36)	ดินร่วน (32.8/47.88/19.36)

หมายเหตุ: พื้นที่ค่าบดบึงพระ ค่าบดบึงพระ และค่าบดบึงพระ อยู่ห่างจากมหาวิทยาลัยนครพนมประมาณ 15 กม. 20 กม. และ 2 กม. ตามลำดับ และพื้นที่ดังกล่าวปลูกผักเป็นอาชีพหลัก

ภาพที่ 1 แปลงทดลองงานวิจัยในพื้นที่ของเกษตรกรทั้ง 5 พื้นที่

พื้นที่ A



พื้นที่ B



พื้นที่ C



พื้นที่ D



พื้นที่ E



ตารางที่ 2 ผลของ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ที่มีต่อความสูงของลำต้นแตงกวา น้ำหนักสดของผลผลิต และการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อทำลายของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ในพื้นที่ A และ B^v.

กรรมวิธี ^v	ค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้น ^w (ซม.)			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวม ^x (กก./แปลง)			ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่แสดงอาการใบต่าง ^y (ต้นพืช/แปลง)		
	ฤดูหนาว 2546			ฤดูหนาว 2546			ฤดูหนาว 2546		
	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A
กรรมวิธีควบคุม	128.6a	83.2b ^z	162.9b	141.8b	7.2b	2.8a	13.5c	13.1b	14.2a
IN937a	135.7a	93.3ab	167.9ab	152.3ab	8.9ab	3.8a	14.8b	13.9ab	11.8b
IN937a+IN937b	140.1a	98.6a	179.4a	158.0a	9.7a	4.3a	17.5a	16.7a	11.2b
LSD _{0.05}	12.7	13.3	13.7	10.9	1.8	1.4	0.8	3.0	1.7

^vทำการวิจัยในแปลงเกษตรกรรมช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2546 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2547) และ ฤดูฝน (เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน 2547) รูปแบบของการทดลองคือ Randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ แต่ละแปลง (กว้าง 1 เมตร ยาว 10 เมตร) คือ ซ้ำของการทดลอง พื้นที่ A และ B อยู่ที่ตำบลวังพระ อ. เมือง จ.พิษณุโลก

^wPGPR สายพันธุ์ IN937a คือ *Bacillus amyloliquefaciens*; สายพันธุ์ IN937b คือ *Bacillus pumilus*

^xวัดค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้นแตงกวาภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 1 เดือน

^yวัดค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมสะสมจากแปลงทดลอง (18 ต้น/แปลง) จนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูก

^zวัดค่าเฉลี่ยจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการใบต่างภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 35 วัน

^zตัวเลขที่มีตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้ least significant difference (LSD)

ภาพที่ 2 อาการใบต่างอย่างรุนแรงของต้นแตงกวาที่ติดเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ในสภาพธรรมชาติบริเวณแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ A และ B



โดยทั่วไปแล้วแตงกวาที่กระตุ้นด้วย PGPR ทั้งสองกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูงและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมมากกว่าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม ในช่วงฤดูหนาว พ.ศ.2546 นั้นพบว่าแตงกวาในพื้นที่ B ที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยความสูงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ส่วนแตงกวาในพื้นที่ A ที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม สำหรับผลการทดลองในช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2547 นั้นพบว่า แตงกวาทั้งในพื้นที่ A และ B ที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยความสูงและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ PGPR สายพันธุ์ IN937a ส่งเสริมให้แตงกวามีผลผลิตมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเพียงพื้นที่ A เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม แม้ว่า PGPR mixtures โดยทั่วไปแล้วส่งเสริมให้แตงกวามีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าและมีผลผลิตรวมที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ PGPR สายพันธุ์ IN937a เพียงอย่างเดียว แต่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผลผลิตรวมในพื้นที่ A ช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2547 เท่านั้น (ตารางที่ 2)

พบเพลี้ยอ่อนแพร่ระบาดบริเวณด้านใต้ใบแตงกวาในพื้นที่ A ตลอดฤดูกาลปลูกของฤดูหนาว พ.ศ. 2546 ในทางตรงกันข้ามพบเพลี้ยอ่อนระบาดเป็นจำนวนมากในพื้นที่ A โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งช่วงปลายฤดูการปลูก ส่วนการทดลองในฤดูฝน พ.ศ. 2547 นั้นเพลี้ยอ่อนปรากฏในแปลงปลูกช้ากว่าในฤดูการที่ผ่านมา นอกจากนี้พบหนอนใยผักและเต่าแตงแดงกัดกินใบพืชบางส่วนในช่วงระยะการเจริญเติบโตของพืช

5.2.2 โรคใบม้วนเหลืองของมะเขือเทศ

ผลการทดลองในฤดูหนาว พ.ศ. 2546 พบอาการใบม้วนเหลืองปรากฏบนใบพืชด้านล่างของมะเขือเทศครั้งแรกก่อนการติดดอก แต่ในการทดลองช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2547 นั้นพบอาการดังกล่าวกับพืชมะเขือเทศภายหลังจากย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 3 สัปดาห์ ซึ่งเกิดขึ้นเร็วกว่าฤดูที่ผ่านมา ต้นมะเขือเทศบางต้นที่ติดเชื้อในกรรมควบคุมแสดงอาการใบม้วนเหลืองทั่วทั้งต้นพืชอย่างรวดเร็ว ทำให้ต้นพืชแคระแกรนและไม่ให้ผลผลิต นอกจากนี้ต้นพืชที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงปรากฏอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณขอบใบร่วมกับอาการใบม้วน จากผลการทดลองพบว่ามะเขือเทศในพื้นที่ A และ B ที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่าประมาณ 22-30% อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม ส่วนมะเขือเทศที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a เพียงอย่างเดียวนั้น มีระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเพียงพื้นที่ B เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับในกรรมวิธีควบคุม สำหรับผลการทดลองในฤดูฝน พ.ศ. 2547 พบว่ามะเขือเทศทั้งสองพื้นที่ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว และมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม ความรุนแรงของโรคในมะเขือเทศที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a และมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุมมีระดับใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3 และรูปที่ 3)

PGPR mixtures ส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตรวมของมะเขือเทศมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองพื้นที่และทั้งสองฤดูกาลปลูกเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ PGPR สายพันธุ์ IN937a ส่งเสริมการเจริญเติบโตและผลผลิตรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเพียงบางพื้นที่และบางฤดูกาลเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม มะเขือเทศที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตและผลผลิตรวมที่มากกว่ามะเขือเทศที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a เพียงอย่างเดียว ซึ่งความแตกต่างของการเจริญเติบโตที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญนั้นปรากฏในพื้นที่ B ทั้งสองฤดูกาลเท่านั้น (ตารางที่ 3) พบแมลงหริ่นขาวกระจายทั่วแปลงบริเวณด้านใต้ใบพืชทั้งสองฤดูกาลปลูก

ตารางที่ 3 ผลของ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ที่มีต่อความสูงของมะเขือเทศ น้ำหนักสดของผลผลิต และการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อทำลายของเชื้อ Tomato Yellow leaf curl virus ในพื้นที่ A และ B^v.

กรรมวิธี ^v	ค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้น ^w (ซม.)				ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวม ^x (กก./แปลง)				ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการใบม้วน เหลือง ^y (%)			
	ฤดูหนาว 2546		ฤดูฝน 2547		ฤดูหนาว 2546		ฤดูฝน 2547		ฤดูหนาว 2546		ฤดูฝน 2547	
	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B
กรรมวิธีควบคุม	96.1b ^z	62.7b	97.5b	86.9c	7.3b	2.7b	6.3b	7.8b	46.4a	60.6a	63.3a	60.4a
IN937a	106.1a	67.4b	107.8a	97.1b	8.8a	3.6ab	8.8a	9.2ab	35.9ab	43.2b	66.0a	53.9a
IN937a+IN937b	109.2a	74.5a	113.9a	104.6a	9.1a	4.0a	9.5a	10.1a	33.8b	38.5b	49.0b	42.3b
LSD _{0.05}	9.7	6.7	8.3	6.9	0.8	1.2	1.4	1.5	12.2	13.5	13.5	10.0

^vทำการวิจัยในแปลงเกษตรกรช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2546 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2547) และ ฤดูฝน (เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน 2547) รูปแบบของการทดลองคือ Randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ แต่ละแปลง (กว้าง 1 เมตร ยาว 10 เมตร) คือ ซ้ำของการทดลอง พื้นที่ A และ B อยู่ติดข้างแปลง อ. เมือง จ. พิษณุโลก

^wPGPR สายพันธุ์ IN937a คือ *Bacillus amyloliquefaciens*; สายพันธุ์ IN937b คือ *Bacillus pumilus*

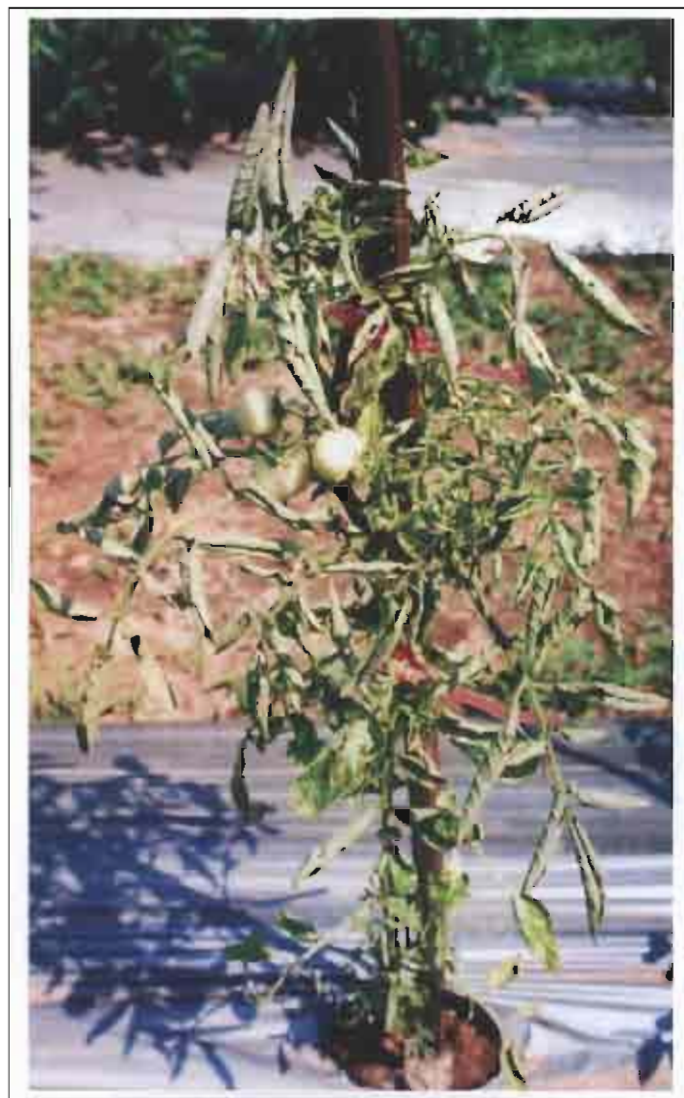
^xวัดค่าเฉลี่ยความสูงของมะเขือเทศภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 1 เดือน

^yวัดค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมสะสมจากแปลงทดลอง (18 ต้น/แปลง) จนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูก

^zวัดค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรคใบม้วนเหลืองของมะเขือเทศภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 60 วัน

ตัวเลขที่มีตัวอักษรด้านหลังกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้ least significant difference (LSD)

ภาพที่ 3 อาการใบม้วนเหลืองอย่างรุนแรงของมะเขือเทศที่ติดเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* ในสภาพธรรมชาติบริเวณแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ A และ B



5.2.3 โรคใบด่างของพริกชี้ฟ้า

ผลการทดลองในช่วงฤดูหนาว พ.ศ. 2546 พบว่าอาการใบด่างปรากฏบนใบอ่อนพริกชี้ฟ้าทั้งในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR และการมวิธีควบคุมภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 3 สัปดาห์ ต้นพริกชี้ฟ้าที่อ่อนแอต่อโรคมีการพัฒนาอาการใบด่างทั่วทั้งต้นพืชอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น พริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่แสดงอาการใบด่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองพื้นที่ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว และพริกชี้ฟ้าในการมวิธีควบคุม ในขณะที่ PGPR สายพันธุ์ IN937a กระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานต่อโรคใบด่างอย่างมีนัยสำคัญเพียงพื้นที่ A เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม พริกชี้ฟ้าทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูงใกล้เคียงกัน

พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR ทั้งสองกรรมวิธีมีผลผลิตรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เฉพาะพื้นที่ A เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยทั่วไปแล้วพบว่าพริกชี้ฟ้าทุกกรรมวิธีในพื้นที่ B มีความสูงเฉลี่ยและผลผลิตรวมน้อยกว่าพริกชี้ฟ้าในพื้นที่ A (ภาพที่ 4 และตารางที่ 4) พบแมลงหริ่งขาวและเพลี้ยอ่อนประปรายบริเวณด้านใต้ใบพืช

ภายหลังการย้ายกล้าลงแปลงได้ประมาณ 2 สัปดาห์ในช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2547 พบว่าเกิดการระบาดของเพลี้ยไฟในแปลงพริกชี้ฟ้าอย่างรุนแรงทั้งสองพื้นที่ ทำให้ต้นใบด้านบนของพริกชี้ฟ้าม้วนงอ ต้นพืชส่วนใหญ่เตี้ยแคระและชะงักการเจริญเติบโต ไม่สามารถให้ผลผลิตได้ ทำให้ไม่มีผลการทดลองนำเสนอในฤดูกาลนี้

ภาพที่ 4 อาการใบด่างของพริกชี้ฟ้าที่ติดเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* ในสภาพธรรมชาติบริเวณแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ A และ B



ตารางที่ 4 ผลของ Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) ที่มีต่อความสูงของพริกชี้ฟ้า น้ำหนักสดของผลผลิต และการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อทำลายของเชื้อ Tomato Yellow leaf curl virus ในพื้นที่ A และ B^๑.

กรรมวิธี ^๑	ค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้น ^๒		(ชม.)		ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวม ^๓		ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่แสดงอาการใบต่าง ^๔		(กก./แปลง)		(ต้นพืช/แปลง)	
	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B	พื้นที่ A	พื้นที่ B
กรรมวิธีควบคุม	72.7 a	52.3 a	7.7 b ^๕	2.6 a	15.2 a	15.4 a						
IN937a	74.5 a	53.9 a	9.3 a	2.8 a	12.8 b	15.2 a						
IN937a+IN937b	76.1 a	56.7 a	9.4 a	2.9 a	9.8 c	11.6 b						
LSD _{0.05}	6.3	7.5	1.5	0.6	2.3	3.1						

^๑ ทำการวิจัยในแปลงเกษตรกรช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2546 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2547) รูปแบบของการทดลองคือ Randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ แต่ละแปลง (กว้าง 1 เมตร ยาว 10 เมตร) คือ ซ้ำของการทดลอง พื้นที่ A และ B อยู่ติดบึงพระ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

^๒ PGPR สายพันธุ์ IN937a คือ *Bacillus amyloliquefaciens*; สายพันธุ์ IN937b คือ *Bacillus pumilus*

^๓ วัดค่าเฉลี่ยความสูงของพริกชี้ฟ้าภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 1 เดือน

^๔ วัดค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตรวมสะสมจากแปลงทดลอง (18 ต้น/แปลง) จนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูการปลูก

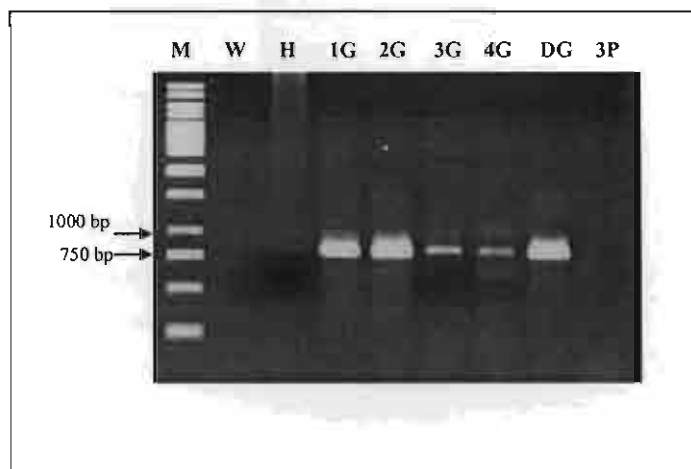
^๕ วัดค่าเฉลี่ยจำนวนต้นพริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการใบต่างภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 60 วัน

^๖ ตัวเลขที่มีตัวอักษรด้านหลังความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ โดยใช้ least significant difference (LSD)

5.2.4 ผลการวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรค

จากผลการวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิค PCR พบว่า อาการใบม้วนเหลืองของมะเขือเทศและอาการใบด่างของพริกชี้ฟ้าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* (ภาพที่ 6) สำหรับเทคนิค Reverse transcriptase-PCR นั้นพบว่าแสงกว่าที่แสดงอาการใบด่างเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 6 การตรวจสอบเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) กับตัวอย่างพืชที่เป็นโรคใบม้วนเหลืองของมะเขือเทศ และโรคใบด่างของพริกชี้ฟ้าที่ติดเชื้อในสภาพธรรมชาติบริเวณแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยวิธีการ polymerase chain reaction (PCR) และ Reverse transcriptase-PCR โดยใช้ coat protein-specific primers



หมายเหตุ:

ช่อง M คือ marker ขนาด 1 kb- DNA

ช่อง W คือ น้ำใช้เป็น negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR

ช่อง H คือ มะเขือเทศปกติใช้เป็น negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR

ช่อง 1G คือ มะเขือเทศที่แสดงอาการใบม้วนเหลืองในกรรมวิธีควบคุม เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส TYLCV (โดยวิธี PCR)

ช่อง 2G คือ มะเขือเทศที่แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณปลายใบร่วมกับอาการใบม้วน เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส TYLCV (โดยวิธี PCR)

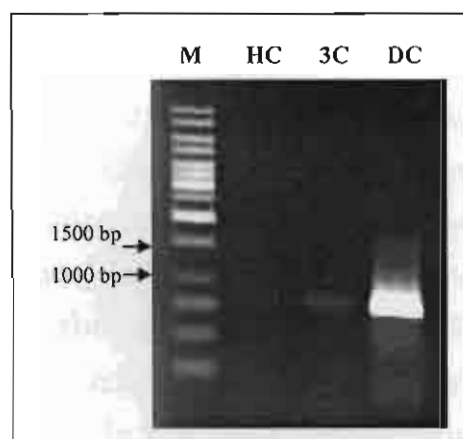
ช่อง 3G คือ มะเขือเทศที่แสดงอาการใบม้วนเหลืองในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส TYLCV (โดยวิธี PCR)

ช่อง 4G คือ พริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการใบด่าง เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส TYLCV (โดยวิธี PCR)

ช่อง DG คือ มะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรัส TYLCV

ช่อง 3P คือ ตัวอย่างที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส *Watermelon mosaic virus* (โดยวิธี RT-PCR)

ภาพที่ 7 การตรวจสอบเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) กับตัวอย่างพืชที่เป็นโรคใบต่างของแตงกวาซึ่งติดเชื้อในสภาพธรรมชาติในแปลงปลูกของเกษตรกร ด้วยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction โดยใช้ coat protein-specific primers



หมายเหตุ:

ช่อง M คือ marker ขนาด 1 kb- DNA

ช่อง HC คือ แตงกวาปกติที่ใช้เป็น negative control สำหรับ CMV

ช่อง 3C คือ แตงกวาที่แสดงอาการใบต่าง เพื่อตรวจสอบ CMV

ช่อง DC คือ แตงกวาที่ติดเชื้อ CMV อย่างรุนแรง

5.3 ประสิทธิภาพของ PGPR ในแปลงเกษตรกรปีที่สองของการศึกษา

5.3.1 การใช้สารเคมีกับพืชในการควบคุมของเกษตรกรอาสาสมัคร

เกษตรกรอาสาสมัครแต่ละรายในพื้นที่ C D และ E ใช้สารกำจัดศัตรูพืช และ ปุ๋ยเคมีที่แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ และมีจำนวนของการใช้แตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล ดังนี้

5.3.1.1 แปลงพริกชี้ฟ้า

ในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 เกษตรกรอาสาสมัครส่วนใหญ่ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงครั้งแรกในช่วงระยะการเจริญเติบโตของพืชและยังคงฉีดพ่นสารฆ่าแมลงต่อไปจนกระทั่งพืชติดดอก เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด cypermethrin ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 และที่ 7 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด chlorpyrifos ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 5 และ 6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด dicofol ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 4 6 และ 7 ภายหลังย้ายต้นกล้าลง

แปลง ส่วนในฤดูฝน พ.ศ. 2548 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C และ E เริ่มฉีดพ่นสารฆ่าแมลงให้กับพริกชี้ฟ้าในช่วงระยะการเจริญจนกระทั่งถึงระยะติดผล เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด cypermethrin ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 9 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง ส่วนเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงต่างชนิดกันโดยฉีดพ่น dicofol ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง และฉีดพ่น dimethoate ในช่วงสัปดาห์ที่ 5 6 7 10 และ 11 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง

เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นสารกำจัดเชื้อราชนิด Mancozeb ให้กับพริกชี้ฟ้าในช่วงสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ภายหลังการย้ายกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 ในขณะที่เกษตรกรในพื้นที่ C และ E ไม่ได้ฉีดสารกำจัดเชื้อราใดๆให้กับพริกเลย

เกษตรกรอาสาสมัครทั้งสามพื้นที่ฉีดพ่นฮอร์โมนชนิด Auxins ให้กับพริกชี้ฟ้า โดยที่ในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 นั้นเกษตรกรในพื้นที่ C ฉีดพ่นฮอร์โมนให้กับพืชในช่วงสัปดาห์ที่ 3 5 และ 6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลง ในขณะที่ฉีดพ่นฮอร์โมนให้กับพืชในช่วงสัปดาห์ที่ 4 5 และ 7 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูฝน พ.ศ. 2548 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นฮอร์โมนให้กับพืชเพียงครั้งเดียวคือช่วงสัปดาห์ที่ 5 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 สำหรับเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E นั้นฉีดพ่นฮอร์โมนครั้งเดียวให้กับพริกชี้ฟ้าในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 แต่ฉีดพ่นฮอร์โมนให้กับพืชในช่วงสัปดาห์ที่ 7 10 และ 11 ในฤดูฝน พ.ศ. 2548

5.3.1.2 แปลงแตงกวา

เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด cypermethrin ให้กับแตงกวา 3 ครั้งทั้งสองฤดูกาล โดยฉีดพ่นในช่วงระหว่างสัปดาห์ที่ 3-6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงของฤดูหนาว พ.ศ. 2547 และฉีดพ่นในช่วงสัปดาห์ที่ 2-6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงของฤดูฝน พ.ศ. 2548 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด chlorpyrifos ให้กับแตงกวาในช่วงสัปดาห์ที่ 4 5 และ 6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงชนิด dicofol ให้กับแตงกวาในช่วงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 ในขณะที่ฉีดพ่น dicofol ให้กับแตงกวาในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และฉีดพ่น dicrotophos อีกครั้งในสัปดาห์ที่ 5 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูฝน 2548

สำหรับสารฆ่าเชื้อรา น้ำคั่งที่เกิดกับพืชแตงกวานั้นเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C ฉีดพ่น metalaxyl ให้กับแตงกวา ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 ในขณะที่ฉีดพ่น metalaxyl ให้กับพืชในช่วงสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูฝน พ.ศ. 2548 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นสาร mancozeb ให้กับพืช 2 ครั้งระหว่างสัปดาห์ที่ 4-6 ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 ส่วนเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E ฉีดพ่น 10% copper sulfate ให้กับแตงกวาในสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังย้ายต้น

กล้างแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 ในขณะที่ฉีดพ่นสารชนิดเดียวกันในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงในฤดูฝน พ.ศ. 2548

เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ C ฉีดพ่นฮอร์โมนชนิด Auxins จำนวน 3 ครั้งให้กับพืชในช่วงสัปดาห์ที่ 3-5 ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 แต่ฉีดพ่นเพียง 2 ครั้งในช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงในฤดูฝน พ.ศ. 2548 เกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ D ฉีดพ่นฮอร์โมนชนิด Auxins ให้กับพืชในสัปดาห์ที่ 5 ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 สำหรับเกษตรกรอาสาสมัครในพื้นที่ E นั้นฉีดพ่นฮอร์โมนชนิด Auxins ให้กับแตงกวาเฉพาะฤดูฝน พ.ศ. 2548 โดยฉีดพ่นในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลง

5.3.2 โรคที่เกิดกับพริกชี้ฟ้า

ในช่วงฤดูหนาว พ.ศ. 2547 พบโรคสองชนิดปรากฏกับพริกชี้ฟ้าในพื้นที่ C ทั้งสองกรรมวิธี โรคชนิดแรกคือโรคใบด่างที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส TYLCV (จากผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR) และโรคอีกชนิดหนึ่งคือโรคเหี่ยวเฉาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* อย่างไรก็ตามพบว่าโรคใบด่างเป็นโรคหลักและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากกว่าโรคเหี่ยวเฉา อาการใบด่างเริ่มปรากฏเป็นครั้งแรกบนใบอ่อนของพริกชี้ฟ้าบางต้น ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงแล้ว 5 สัปดาห์ จากนั้นต้นพืชที่อ่อนแอมีการติดเชื้อทั่วทั้งต้นพืช สำหรับต้นพริกชี้ฟ้าบางต้นที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเฉานั้นใบพืชบางส่วนเริ่มแสดงอาการเหี่ยวทันทีก่อนช่วงระยะติดดอก ต่อมาต้นพืชที่อ่อนแอแสดงอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นพืชและตายในช่วงระยะติดผล (ภาพที่ 8 และ 9) เนื้อเยื่อลำเลียงของลำต้นพืชที่ติดเชื้อโรคเหี่ยวเฉาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อตัดลำต้นพืชที่ติดเชื้อแล้วจุ่มลงในน้ำใสๆที่บรรจุในปิเก็ตเจอร์จะพบกลุ่มแบคทีเรียสีขาวของเชื้อสาเหตุโรคไหลออกมาเป็นทางยาวจากบริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงที่ติดเชื้อ เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่เป็นโรคทั้งสองชนิดมีเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป พริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่เป็นโรคใบด่างน้อยกว่าประมาณ 40% ภายหลังย้ายต้นกล้างแปลงแล้ว 11 สัปดาห์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่เป็นโรคเหี่ยวเฉาทั้งสองกรรมวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ผลผลิตรวมพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีมากกว่าประมาณ 26% เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มของผลผลิตพริกชี้ฟ้า และต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* เชื้อ *Ralstonia solanacearum* และเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรในพื้นที่ C พื้นที่ D และพื้นที่ E แล้ว 11 สัปดาห์ ในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2548)

กรรมวิธี ^a	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่เป็นโรค				พื้นที่ E ^t โคนนา ^w	ผลผลิตรวม ^x		Total fruit yield at field E (Kg)
	พื้นที่ C ^u		พื้นที่ ^v			พื้นที่ C (กก)	พื้นที่ D (กก)	
	ใบต่าง ^u	เหี่ยวเหี่ยว ^v	เหี่ยวเหี่ยว	ใบต่าง				
กรรมวิธีควบคุม	78.63±2.12 ^y	2.72±0.40	96.90±1.96	77.35±5.48	13.05±2.09	378.7	26.0	234.7
PGPR mixtures	46.88±4.10 ^{**}	2.03±0.29	66.86±9.33 [*]	42.84±4.31 ^{**}	5.40±1.77 [*]	510.5	89.0	299.1

^aรูปแบบการทดลองคือ randomized of treatments. PGPR mixtures คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับเชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b พื้นที่ C และพื้นที่ D อยู่ใต้บาบวัดพริก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ส่วนพื้นที่ E อยู่ใต้บาบวัดท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก

^xกรรมวิธีควบคุมมีแปลงทดลองจำนวน 11 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 20 ม.) แต่แปลงมีต้นพืช 40 ต้น กรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 7 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 32 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืช 63 ต้น

^yกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 5 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 29 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืช 58 ต้น

^wกรรมวิธีควบคุมมีแปลงทดลองจำนวน 4 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 45 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืช 90 ต้น กรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 5 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 36 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืช 72 ต้น

^uโรคใบด่างเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิด *Tomato yellow leaf curl virus*

^vโรคเหี่ยวเหี่ยวเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

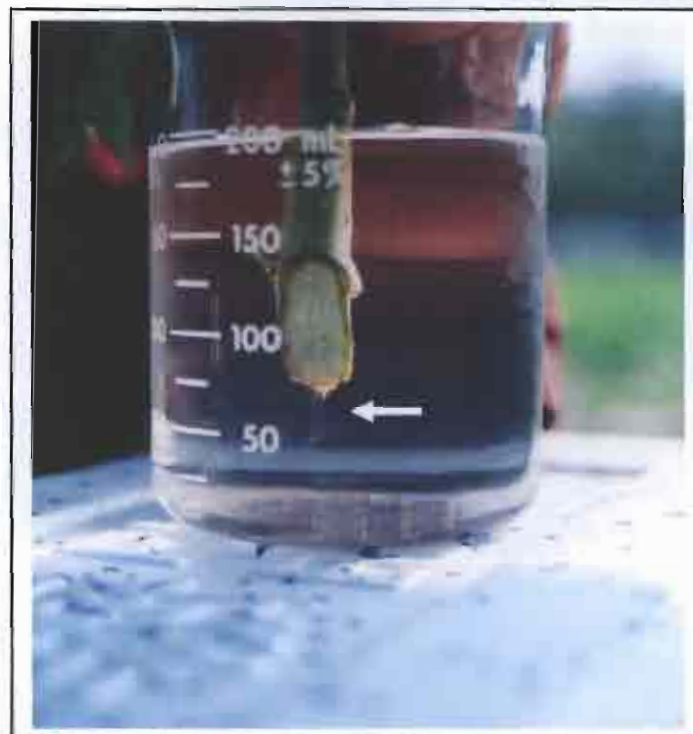
^wโรคโคนเน่าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*.

^xผลผลิตรวมของพริกชี้ฟ้าเก็บสะสมจากเริ่มเก็บเกี่ยวจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูการปลูกซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีทั้งสองได้เนื่องจากการเก็บแต่ละครั้งนั้นเกษตรกรนำผลผลิตแต่ละแปลงมารวมกัน

^yตัวเลขที่อยู่หลังสัญลักษณ์ ± แสดงค่า standard error mean

^{*}และ ^{**}ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี PGPR mixtures เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับโดยใช้ Independent Samples t-Test.

ภาพที่ 8 ต้นพริกชี้ฟ้าแสดงอาการเหี่ยวเฉาในช่วงระยะติดดอก (ภาพบน) และกลุ่มแบคทีเรียสี
ขาวของเชื้อสาเหตุโรคไหลออกมาเป็นทางยาว (ลูกศรชี้) จากบริเวณเนื้อเยื่อลำเลียงที่ติดเชื้อ
(ภาพล่าง)



ภาพที่ 9 พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมที่แสดงอาการเหี่ยวตายเป็นจำนวนมากในช่วงระยะที่พืชกำลังติดผล (ภาพบน) เปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับ สายพันธุ์ IN937b (ภาพล่าง)



สำหรับในพื้นที่ D นั้นพบว่าโรคเหี่ยวเหี่ยวเป็นโรคเพียงชนิดเดียวที่ปรากฏกับพริกชี้ฟ้าทั้งสองกรรมวิธี อาการเหี่ยวเหี่ยวเริ่มปรากฏกับใบพริกชี้ฟ้าบางส่วนของต้นในช่วงที่พืชกำลังติดผล ต้นพริกชี้ฟ้าทั้งต้นในกรรมวิธีควบคุมที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคแสดงอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นพืชภายในระยะเวลาอันรวดเร็วและตายในช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว ช่วงปลายฤดูการปลูกพบว่าต้นพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมเกือบทุกต้นติดเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยวและตายในที่สุด ส่วนพริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures นั้นมีจำนวนต้นที่ติดโรคเหี่ยวเหี่ยวเล็กน้อยในช่วงกลางของฤดูการปลูกแต่มีจำนวนต้นที่ติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงปลายของฤดูการปลูก ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 11 สัปดาห์พบว่า พริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่ติดโรคเหี่ยวเหี่ยวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 31% เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุม อีกทั้งผลผลิตรวมของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีมากกว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมประมาณ 70% (ตารางที่ 5)

โรคที่สำคัญซึ่งเกิดในพื้นที่ E คือโรคใบด่าง โรคดังกล่าวปรากฏบนใบอ่อนพริกชี้ฟ้าบางต้นภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงแล้ว 1 เดือน จากผลการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบว่าอาการใบด่างพริกชี้ฟ้าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ TYLCV สำหรับโรคโคนเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* (ภาพที่ 11) นั้นเป็นโรครองลงมาจากรโรคใบด่างซึ่งพบกับพริกชี้ฟ้าทั้งสองกรรมวิธี พืชที่เป็นโรคจะแสดงอาการเหี่ยวเหลืองและตายในที่สุด นอกจากนี้สามารถสังเกตเห็นเม็ด sclerotia สีน้ำตาลและกลุ่มเส้นใยสีขาวของเชื้อราล้อมรอบโคนต้นของพริกชี้ฟ้าที่ติดเชื้อ โดยทั่วไปแล้วพริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures ด้านทานต่อการเกิดโรคทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญตลอดฤดูการปลูกโดยมีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่เป็นโรคใบด่าง และโรคโคนเน่าน้อยกว่าประมาณ 55% และ 58% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีผลผลิตรวมมากกว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมประมาณ 20% (ตารางที่ 5)

สำหรับผลการทดลองในฤดูฝน พ.ศ. 2548 พบว่าโรคชนิดเดียวกันเริ่มปรากฏกับพริกชี้ฟ้าในระยะเวลาใกล้เคียงกันภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรรม จำนวนโรคใบด่างที่ปรากฏในพื้นที่ C เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง ในฤดูการนี้พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่เป็นโรคเหี่ยวเหี่ยวมากกว่าในฤดูการที่ผ่านมา อีกทั้งต้นพริกชี้ฟ้าทั้งสองกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าในฤดูการที่แล้ว พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่เป็นโรคใบด่างและโรคเหี่ยวเหี่ยวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญตลอดฤดูการปลูกเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังมีผลผลิตที่มากกว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุมประมาณ 30% (ตารางที่ 6)

พริกชี้ฟ้าในพื้นที่ E มีจำนวนต้นที่เป็นโรคใบด่างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงปลูก ในขณะที่จำนวนต้นที่เป็นโรคโคนเน่าเกิดขึ้นช้ากว่าและน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูการที่แล้ว พบว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่ติดเชื้อทั้งสองชนิดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และมีผลผลิตรวมมากกว่าประมาณ 11%

เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 6) พบเพลี้ยอ่อนและแมลงหริ่งขาว
ประปรายบริเวณแปลงปลูก

5.3.3 โรคพืชที่เกิดกับแตงกวา

จากผลการทดลองในฤดูหนาว พ.ศ. 2547 พบว่าโรคราน้ำค้างเป็นโรคหลักที่สำคัญของ
แตงกวาทั้งสามพื้นที่ โรคนี้เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis*
ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรประมาณ 3 สัปดาห์ พบอาการจุดสีเหลืองซีดมีขนาดไม่
แน่นอนปรากฏบริเวณผิวใบพืชที่อยู่ส่วนล่างของลำต้นแตงกวา (ภาพที่ 12) สามารถสังเกต
อาการของโรคนี้ได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเช้าตรู่จะพบกลุ่มของก้านชูสปอร์ของเชื้อราเป็น
จุดๆบริเวณด้านใต้ใบพืช ในพืชที่อ่อนแอแล้วโรคราน้ำค้างจะแพร่กระจายจากใบด้านล่างของลำ
ต้นขึ้นมายังใบที่อยู่ด้านบนของลำต้นอย่างรวดเร็ว ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรแล้ว 5
สัปดาห์พบว่า แตงกวาที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures ทั้งสามพื้นที่มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของ
โรคราน้ำค้างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแตงกวาในกรรมวิธีควบคุม แตงกวาที่
ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures ในพื้นที่ C และ D ยังคงมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคราน้ำค้าง
น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาผ่านไปอีก 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 13) ส่วนใหญ่แล้วแตงกวาใน
กรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีผลผลิตรวมมากกว่าแตงกวาในกรรมวิธีควบคุมยกเว้น
แตงกวาในพื้นที่ D (ตารางที่ 7) สำหรับผลการทดลองในฤดูฝน พ.ศ. 2548 นั้นพบว่า PGPR
mixtures มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นแตงกวาด้านทานโรคราน้ำค้างเช่นเดียวกับที่ปรากฏใน
ฤดูกาลที่แล้ว และแตงกวาในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures นั้นมีผลผลิตรวมมากกว่า
แตงกวาในกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 ผลของ PGPR mixtures ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มของผลผลิตพริกชี้ฟ้าและต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* เชื้อ *Ralstonia solanacearum* และเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรในพื้นที่ C พื้นที่ D และพื้นที่ E แล้ว 11 สัปดาห์ ในช่วงฤดูหนาว (เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน 2548)

กรรมวิธี ^q	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่เป็นโรค				ผลผลิตรวม ^w	
	พื้นที่ C ^r		พื้นที่ E ^s		พื้นที่ C	พื้นที่ E
	ใบต่าง ^t	เหี่ยวเฉียว ^u	ใบต่าง	โคนเน่า ^v	(กก)	(กก)
กรรมวิธีควบคุม	34.68±1.59 ^x	9.06±1.41	90.70±2.76	7.14±0.58	80.5	172.1
PGPR mixtures	29.37±1.75 [*]	2.50±1.25 ^{**}	80.75±2.49 [*]	3.90±0.67 [*]	115.2	194.0

^qรูปแบบการทดลองคือ randomized of treatments. PGPR mixtures คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับเชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b พื้นที่ C อยู่ที่ตำบลวัดพริก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ส่วนพื้นที่ E อยู่ที่ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก

^rกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 8 แปลง (กว้าง 1 ม.ยาว 20 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 40 ต้น

^sกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 4 แปลง (กว้าง 1 ม.ยาว 35 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 70 ต้น

^tโรคใบด่างเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิด *Tomato yellow leaf curl virus* Mosaic disease is caused by *Tomato yellow leaf curl virus*

^uโรคเหี่ยวเฉียวเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

^vโรคโคนเน่าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*.

^wผลผลิตรวมของพริกชี้ฟ้าเก็บสะสมจากเริ่มเก็บเกี่ยวจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูกซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีทั้งสองได้เนื่องจากเก็บแต่ละครั้งในเกษตรกรกรนำผลผลิตแต่ละแปลงมารวมกัน

^xตัวเลขที่อยู่หลังสัญลักษณ์ ± แสดงค่า standard error mean

^{*} และ ^{**}ระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี PGPR mixtures เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ โดยใช้ Independent Samples t-Test.

ตารางที่ 7 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มของผลผลิตแตงกวาและต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรรมในพื้นที่ C พื้นที่ D และพื้นที่ E ในช่วง 5 และ 7 สัปดาห์ของการทดลองในฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2547 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2548).

กรรมวิธี ^a	พื้นที่ C ^b			พื้นที่ D ^c			พื้นที่ E ^d		
	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงโรคราน้ำค้าง ^e			ค่าเฉลี่ยความรุนแรงโรคราน้ำค้าง			ค่าเฉลี่ยความรุนแรงโรคราน้ำค้าง		
	5 WAT ^h	7 WAT	รวม (กก) ^f	5 WAT	7 WAT	รวม (กก)	5 WAT	7 WAT	รวม (กก)
กรรมวิธีควบคุม	20.0±2.13 ^g	60.42±3.71	913.5	35.00±6.12	75.00±0.00	249.9	43.75±6.25	50.00±10.21	243.0
PGPR mixtures	10.0±0.00 ^{**}	37.50±4.72 ^{**}	1,013.8	19.00±3.67 [*]	55.00±5.00 ^{**}	231.3	13.00±3.00 ^{**}	35.00±6.12	265.0

^aรูปแบบการทดลองคือ randomized of treatments. PGPR mixtures คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับเชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b พื้นที่ C และพื้นที่ D อยู่ใต้บ้านวัดพริก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ส่วนพื้นที่ E อยู่ใต้บ้านท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก ^bกรรมวิธีควบคุมมีแปลงทดลองจำนวน 12 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 20 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 40 กรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 8 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 30 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 60 ต้น กรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 5 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 29 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 58 ต้น ^cกรรมวิธีควบคุมมีแปลงทดลองจำนวน 4 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 45 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 90 ต้น กรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลอง 5 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 36 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 72 ต้น ^dความรุนแรงของโรคราน้ำค้างแบ่งออกเป็น 6 สเกล ดังนี้ 0=ไม่เกิดโรค; 1=เกิดโรค 10% ของต้นพืชในแปลงทดลอง; 2=เกิดโรค 25% ของต้นพืชในแปลงทดลอง; 3=เกิดโรค 50% ของต้นพืชในแปลงทดลอง; 4=เกิดโรค 75% ของต้นพืชในแปลงทดลอง; 5=ต้นพืชแสดงอาการโรคราน้ำค้าง 100% ทว่าทั้งต้นพืชตลอดแปลงทดลอง บันทึกความรุนแรงของโรค 1 ครั้งโดยเดินสังเกตอาการของโรคตลอดแนวของแปลงทดลอง ^eผลโดยรวมของแตงกวาเก็บเกี่ยวจากเริ่มเก็บเกี่ยวจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูกซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีทั้งสองได้เนื่องจากมีการเก็บแต่ละครั้งนั้นเกษตรกรนำผลผลิตแต่ละแปลงมาวางกัน ^fตัวเลขที่อยู่หลังสัญลักษณ์ ± แสดงค่า standard error mean ^gWAT คือสัปดาห์หลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรรม และ ^hระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี PGPR mixtures เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% โดยใช้ Independent Samples t-Test

ตารางที่ 8 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มของผลผลิตแตงกวาและต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกรในพื้นที่ C และพื้นที่ E ในช่วง 5 และ 7 สัปดาห์ของการทดลองในฤดูฝน (เดือนมิถุนายน ถึง เดือนกันยายน 2548).

Treatment ^a	Field C ^b		Field E ^c	
	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงโรคราน้ำค้าง ^d		ค่าเฉลี่ยความรุนแรงโรคราน้ำค้าง	
	5 WAT ^e	7 WAT	5 WAT	7 WAT
กรรมวิธีควบคุม	55.00±1.83 ^g	80.63±1.67	34.53±2.56	67.0±2.08
PGPR mixtures	32.50±1.83 ^{**}	70.00±1.83 ^{**}	17.50±2.52 ^{**}	62.5±2.25
				458.6

^aรูปแบบการทดลองคือ randomized of treatments. PGPR mixtures คือเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับเชื้อ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b พื้นที่ C อยู่ที่ตำบลวัดพริก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ส่วนพื้นที่ E อยู่ที่ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จ.พิษณุโลก

^bกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 8 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 20 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 40 ต้น

^cกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธี PGPR mixtures มีแปลงทดลองจำนวน 4 แปลง (กว้าง 1 ม. ยาว 35 ม.) แต่ละแปลงมีต้นพืชจำนวน 70 ต้น

^dบันทึกความรุนแรงของโรคราน้ำค้างในพื้นที่ C และพื้นที่ E จำนวน 5 ครั้ง และ 8 ครั้ง ตามลำดับ ตลอดความยาวของแปลง

^eผลผลิตรวมของแตงกวาเริ่มเก็บเกี่ยวจนกระทั่งเสร็จสิ้นฤดูกาลปลูกซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีทั้งสองได้เนื่องจากการเก็บแต่ละครั้งนั้นเกษตรกรนำผลผลิตแต่ละแปลงมารวมกัน

^fWAT คือสัปดาห์ภายหลังย้ายต้นกล้าลงแปลงเกษตรกร

^gตัวเลขที่อยู่หลังสัญลักษณ์ ± แสดงค่า standard error mean

^{**} ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธี PGPR mixtures เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยใช้ Independent Samples t-Test

ภาพที่ 11 พริกชี้ฟ้าแสดงอาการเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* (ภาพบน) และเส้นใยของเชื้อรา ร่วมกับเม็ด sclerotia บริเวณโคนต้นของพริกชี้ฟ้าที่เป็นโรค (ภาพล่าง)



ภาพที่ 12 ลักษณะอาการราน้ำค้างบนใบแตงกวาที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา
Pseudoperonospora cubensis



ภาพที่ 13 อาการราน้ำค้างบนใบแตงกวากรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (ภาพซ้าย)
เปรียบเทียบกับอาการโรคราน้ำค้างบนใบแตงกวาในกรรมควบคุม (ภาพขวา)



ระดับความรุนแรงของราน้ำค้าง

5.4 ความรู้และความตระหนักของเกษตรกรที่มีต่อการใช้ PGPR เป็นส่วนหนึ่งในการควบคุมโรคพืช

5.4.1 ผู้เข้าร่วมอบรมสัมมนา

พบว่า เกษตรกรที่ตอบแบบสอบถามทั้งหมด 32 คน เป็นชาย 9 คน (ร้อยละ 28.1) เป็นหญิง 23 คน (ร้อยละ 71.9) อายุเฉลี่ย 44 ปี (น้อยที่สุด 23 ปี และมากที่สุด 70 ปี) ครึ่งหนึ่งของเกษตรกรที่เข้าร่วมการอบรมสัมมนาจบการศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 4 หรือเทียบเท่า ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้เข้าร่วมอบรมสำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาปีที่ 3 หรือสูงกว่า ดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 14

ตารางที่ 9 ลักษณะประชากรของเกษตรกรผู้เข้าร่วมสัมมนา (ที่ตอบแบบสอบถาม)

ลักษณะทางประชากร	
เพศ, ร้อยละ (n)	
ชาย	28.1 (9)
หญิง	71.9 (23)
อายุเฉลี่ย (พิสัย)	
44.32 (23-70)	
การศึกษา, ร้อยละ (n)	
ต่ำกว่าชั้น ป.4	3.1 (1)
ป.4 หรือเทียบเท่า	50.0 (16)
ป.6 หรือเทียบเท่า	12.5 (4)
ม.3 หรือเทียบเท่า	18.8 (6)
ม.6 หรือเทียบเท่า	15.6 (5)

5.4.2 ผลของการอบรมที่มีต่อความรู้และความตระหนักของเกษตรกร

การวัดความรู้ของเกษตรกรทำโดยใช้แบบสอบถามที่มีคำถาม 10 ข้อ ผลของความรู้ของเกษตรกรก่อนอบรม หลังการอบรมทันที 1 เดือนภายหลังการอบรม 3 เดือนภายหลังการอบรม และ 6 เดือนภายหลังการอบรมแสดงไว้ในตารางที่ 10 และภาพที่ 15



ผู้วิจัย คณาจารย์และทีมงานที่ช่วยดำเนินการอบรมสัมมนา
ฟิจิพีอาร์



ทีมงานช่วยกันสัมภาษณ์เกษตรกรก่อนการอบรมสัมมนา



การบรรยายเกี่ยวกับฟิจิพีอาร์ให้แก่เกษตรกรที่เข้ารับการอบรม
ภายหลังการสัมภาษณ์



การศึกษาดูงานที่แปลงทดลอง PGPR ของคณะเกษตรศาสตร์ฯ
มหาวิทยาลัยนเรศวร



ทีมงานช่วยกันสัมภาษณ์เกษตรกร ภายหลังการอบรม



ภาพหมู่ของเกษตรกร ผู้วิจัย และผู้บริหารของคณะเกษตรศาสตร์ฯ
มหาวิทยาลัยนเรศวรภายหลังการอบรมสัมมนา

ภาพที่ 14 ภาพกิจกรรมของการอบรมสัมมนา PGPR



ภาพที่ 15 กิจกรรมการสัมภาษณ์เกษตรกรภายหลังจากอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ความรู้ของผู้เข้าร่วมอบรมที่มีต่อการจัดการศัตรูพืชและการควบคุมทางชีวภาพ ก่อนการอบรม หลังการอบรมทันที หลังการอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือนตามลำดับ

คำถาม	จำนวน (ร้อยละ) ของผู้ที่ตอบคำถามถูกต้อง				
	ก่อนอบรม (n=32)	หลังอบรมทันที (n=32)	หลังอบรม 1 เดือน (n=14)	หลังอบรม 3 เดือน (n=10)	หลังอบรม 6 เดือน (n=12)
1. การเก็บเกี่ยวผลผลิต การเกษตร ควรทำหลังการฉีดพ่นสารเคมีนานเท่าไรจึงจะปลอดภัย	20 (62.5)	27 (84.4) ^{a,*}	9 (64.3)	1 (10.0) ^{c,*}	10 (83.3)
2. เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส บางชนิดที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชได้ จริงหรือไม่	23 (71.9)	24 (75.0)	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
3. พืชสามารถสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันโรคได้เหมือนคน	10 (31.3)	16 (50.0) ^{a,*}	6 (42.9)	4 (40.0)	5 (41.7)
4. การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ คืออะไร	11 (34.4)	17 (53.1) ^{a,*}	2 (14.3) ^{c,*}	3 (30.0)	4 (33.3)
5. เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส บางชนิดที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ มีประโยชน์หรือไม่	13 (40.6)	26 (81.3) ^{a,**}	10 (71.4)	5 (50.0)	12 (100.0) ^{c,*}
6. นอกจากการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดโรคพืชแล้ว ยังมีวิธีการอื่นอีกหรือไม่	24 (75.0)	28 (87.5)	12 (85.7)	7 (70.0)	10 (83.3)
7. พืชฟิอาร์ (PGPR) คืออะไร	1 (3.1)	27 (84.4) ^{a,**}	11 (78.6)	7 (70.0)	10 (83.3)
8. พืชฟิอาร์ (PGPR) มีประโยชน์อย่างไร	5 (15.6)	27 (84.4) ^{a,**}	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
9. พืชฟิอาร์ (PGPR) <u>ไม่มี</u> ประโยชน์ต่อพืชด้านใด	5 (15.6)	25 (78.1) ^{a,**}	11 (78.6)	9 (90.0)	9 (75.0)
10. พืชฟิอาร์ (PGPR) มีวิธีการใช้อย่างไร	4 (12.5)	30 (93.8) ^{a,**}	14 (100.0)	9 (90.0)	10 (83.3)
คะแนนรวม±SD	3.63±1.98	7.72±1.84 ^{b,**}	7.21±1.80	6.22±2.28	7.67±2.39

^a ใช้ Wilcoxon Signed Ranks ทดสอบเปรียบเทียบกับก่อนอบรม ^b ใช้ Paired Samples t Test เปรียบเทียบกับก่อนอบรม

^{*} ใช้ Wilcoxon Signed Ranks ทดสอบเปรียบเทียบหลังการอบรมทันที ^{*} P<0.05

ตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าก่อนการอบรมนั้นผู้เข้าร่วมอบรมส่วนใหญ่ตอบคำถามข้อ 1 2 และ 6 ถูกต้องประมาณ 60-75% ในขณะที่ผู้เข้าร่วมอบรมตอบคำถามข้อ 3 4 และ 5 ถูกต้องประมาณ 30-40% มีส่วนน้อยที่สามารถตอบคำถามข้อ 7 8 9 และ 10 ได้อย่างถูกต้องซึ่งคำถามดังกล่าวเป็นคำถามที่เฉพาะเจาะจงเกี่ยวกับเทคนิคที่ใช้กับ ภายหลังการอบรมทันทีพบว่าผู้เข้าร่วมอบรมมากกว่า 75% ตอบคำถามถูกต้องทุกข้อ ยกเว้นคำถามข้อ 3 และ 4 ซึ่งเป็นคำถามความรู้ทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับเชื้อสาเหตุโรคและการควบคุมโรคพิษโดยชีววิธี มีผู้เข้าร่วมอบรมเพียง 50% ที่ตอบคำถามทั้งสองข้อได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตามผลการตอบคำถามที่ถูกต้องในข้อ 3 และ 4 ภายหลังการอบรมทันทีนั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบผลการตอบคำถามก่อนการอบรม (คำถามข้อที่ 3 หลังการอบรมตอบถูก 50% เปรียบเทียบกับก่อนการอบรมตอบถูกเพียง 31.3% คำถามข้อที่ 4 หลังการอบรมตอบถูก 53.1% เปรียบเทียบกับก่อนการอบรมตอบถูกเพียง 34.4%) โดยภาพรวมแล้วพบว่าคะแนนความรู้ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ภายหลังการอบรมทันที และระดับความรู้ก็ยังยั่งยืนนานภายหลังการอบรมไปแล้วประมาณ 6 เดือน

ตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าก่อนการอบรมนั้นผู้เข้าร่วมอบรมส่วนใหญ่มีความรู้สึกในแง่ดีต่อการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ยกตัวอย่างเช่น ผู้เข้าร่วมอบรมประมาณ 34% เห็นด้วยว่าการใช้สารกำจัดศัตรูพืชไม่มีอันตรายต่อเกษตรกรที่ใช้สารดังกล่าว แม้ว่าผู้เข้าร่วมอบรมส่วนใหญ่ (97%) ทราบดีว่าสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้นั้นสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมก็ตาม แต่ประมาณ 50% เชื่อว่าสิ่งแวดล้อมสามารถทำลายหรือกำจัดสารเคมีที่ตกค้างอยู่ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว ผู้เข้าร่วมอบรมประมาณ 25% เข้าใจว่าผู้บริโภคสามารถรับประทานพืชผักที่มีการใช้สารเคมีได้อย่างปลอดภัย และผู้เข้าร่วมอบรมประมาณ 44% เชื่อว่าสารกำจัดศัตรูพืชมีประสิทธิภาพในการกำจัดแน่นอน ผู้เข้าร่วมอบรมประมาณ 75% คิดว่าปัจจุบันนี้เขาเหล่านั้นมีวิธีการจัดการศัตรูพืชที่ให้ผลดีอยู่แล้ว และประมาณ 60% ตอบว่าการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโรคพืชเป็นวิธีการที่ได้รับผลตอบแทนคุ้มค่ากับการลงทุน ผู้เข้าร่วมอบรมประมาณ 34% เห็นด้วยว่าควรมีวิธีควบคุมศัตรูพืชและโรคพืชแบบอื่นมาทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีอยู่ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการอบรมนี้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความตระหนักของผู้เข้าร่วมอบรมได้อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นคำถามในข้อที่ 7 ซึ่งเป็นคำถามเกี่ยวกับ “สิ่งแวดล้อมสามารถทำลายหรือกำจัดสารเคมีที่ตกค้างอยู่ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว” นั้น พบว่าภายหลังการอบรมทันทีผู้เข้าร่วมอบรมส่วนใหญ่ไม่เห็นด้วยกับคำถามดังกล่าวซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการอบรม (หลังการอบรมเห็นด้วยเพียง 18.7% ก่อนการอบรมเห็นด้วย 50%; $P \leq 0.05$) เมื่อติดตามผลความตระหนักจนกระทั่ง 6 เดือนภายหลังการอบรมไปแล้วพบว่าระดับความตระหนักดังกล่าวยังคงเหมือนเดิมเช่นเดียวกับที่พบก่อนการอบรม

ตารางที่ 11 ความตระหนักของผู้เข้าร่วมอบรมที่มีต่อการจัดการศัตรูพืชและวิธีการควบคุมโดยชีวภาพ ก่อนการอบรม ภายหลังการอบรมทันที หลังการอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ

คำถาม	จำนวน (ร้อยละ) ของผู้ที่เห็นด้วย หรือเห็นด้วยอย่างยิ่ง				
	ก่อนการอบรม (n=32)	ภายหลังการ อบรมทันที (n=32)	ภายหลัง การอบรม 1 เดือน(n=14)	ภายหลังการ อบรม 3 เดือน (n=10)	ภายหลังการ อบรม 6 เดือน (n=12)
1. การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชและโรคพืช <u>ไม่มีอันตรายใดๆ</u> ต่อผู้สัมผัส หรือ เกษตรกร	11 (34.4)	7 (21.9)	3 (21.4)	8 (80.0)	4 (33.3)
2. ควรมีวิธีควบคุมศัตรูพืชและโรคพืชแบบอื่นมาทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช	27 (84.4)	25 (78.1)	12 (85.7)	8 (80.0)	12 (100.0)
3. สารเคมีที่เกษตรกรใช้กำจัดศัตรูพืชและโรคพืช จะตกค้างอยู่ในดินและสิ่งแวดล้อม	31 (96.9)	28 (87.6)	12 (85.7)	10 (100.0)	12 (100.0)
4. ท่านสามารถควบคุมศัตรูพืชและโรคพืชได้แน่นอนเมื่อใช้สารเคมี.	14 (43.7)	16 (50.0)	7 (50.0)	5 (50.0)	7 (58.3)
5. การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโรคพืช เป็นวิธีการที่ได้รับผลตอบแทนคุ้มค่ากับการลงทุน	19 (59.4)	20 (62.6)	9 (64.3)	6 (60.0)	8 (66.7)
6. ผู้บริโภคสามารถรับประทานพืชผักที่มีการใช้สารเคมีได้อย่างปลอดภัย	8 (25.0)	8 (25.1)	6 (42.9)	7 (70.0)	5 (41.7)
7. โดยธรรมชาติ ดินและสิ่งแวดล้อมสามารถกำจัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและโรคพืช ที่ตกค้างอยู่ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว	16 (50.0)	6 (18.7) ^a	6 (42.9)	4 (40.0)	6 (50.0)
8. ท่านมีวิธีการกำจัดและควบคุมศัตรูพืชและโรคพืชที่ได้ผลดีอยู่แล้ว	24 (75.0)	21 (65.7)	9 (64.3)	4 (40.0)	8 (66.7)
9. วิธีการใหม่ๆ <u>ไม่มีผล</u> ต่อการเปลี่ยนแปลงการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโรคพืชของท่านที่ทำอยู่เดิม	11 (34.4)	8 (25.0)	6 (42.9)	3 (30.0)	1 (16.7)
10. โดยภาพรวม ท่านพอใจในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยใช้สารเคมีมากกว่าวิธีอื่นๆ	22 (68.8)	16 (50.0)	10 (71.4)	5 (50.0)	6 (50.0)

^a ใช้ Wilcoxon Signed Ranks ทดสอบเปรียบเทียบกับก่อนการอบรม

* $P < 0.01$

ผู้วิจัยได้นำคำถามจากตารางที่ 11 มาจัดกลุ่มและแบ่งความตระหนักของผู้เข้าร่วมอบรมที่มีต่อสารกำจัดศัตรูพืชออกเป็น 3 หัวข้อใหญ่ๆ ดังนี้ หัวข้อที่ 1 ความตระหนักเกี่ยวกับอันตรายของสารกำจัดศัตรูพืช หัวข้อที่ 2 ความตระหนักเกี่ยวกับความไม่คุ้มทุนในการใช้สารกำจัดศัตรูพืช และหัวข้อที่ 3 คือ ความตระหนักเกี่ยวกับทางเลือกใหม่ที่น่ามาทดแทนการใช้สารกำจัดศัตรูพืช (ตารางที่ 12) คะแนนที่มากขึ้นบ่งบอกถึงความตระหนักเกี่ยวกับหัวข้อยังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ก่อนการอบรมพบว่าผู้เข้าร่วมอบรมมีความตระหนักในระดับปานกลางทุกหัวข้อนั้นหมายความว่าทุกคนมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อผ่านการอบรมทันทีพบว่าความตระหนักเกี่ยวกับอันตรายของสารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการอบรม อย่างไรก็ตามความตระหนักเกี่ยวกับความไม่คุ้มทุนและความตระหนักเกี่ยวกับทางเลือกใหม่ยังคงมีระดับเดียวกันภายหลังการอบรมไปแล้ว เมื่อติดตามผลของความตระหนักของทุกหัวข้อจนกระทั่งถึง 6 เดือนภายหลังการอบรม พบว่าความตระหนักส่วนใหญ่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปจากผลที่ได้ภายหลังการอบรมทันที ยกเว้นความตระหนักเกี่ยวกับความไม่คุ้มทุนของสารกำจัดศัตรูพืชที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.005$) ภายหลังการอบรมแล้ว 6 เดือน

ตารางที่ 12 หัวข้อหลักเกี่ยวกับความตระหนักต่างๆเกี่ยวกับสารกำจัดศัตรูพืชของผู้เข้าร่วมอบรม ในช่วงก่อนการอบรม ภายหลังการอบรมทันที หลังการอบรม 1 เดือน 3 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ

หัวข้อความตระหนัก	คะแนนค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation				
	ก่อนการอบรม (n=32)	หลังการอบรม ทันที (n=32)	หลังการอบรม 1 เดือน (n=14)	หลังการอบรม 3 เดือน (n=10)	หลังการอบรม 6เดือน (n=12)
1. ความตระหนักเกี่ยวกับอันตรายของสารกำจัดศัตรูพืช (1, 3r ^c , 6, 7)	11.93 $\pm$ 1.94	12.07 $\pm$ 1.87 ^a	11.43 $\pm$ 2.28	11.20 $\pm$ 2.90	11.42 $\pm$ 1.78
2. ความตระหนักเกี่ยวกับความไม่คุ้มทุนของการใช้สารกำจัดศัตรูพืช (4, 5)	4.87 $\pm$ 1.41	4.48 $\pm$ 1.40	4.79 $\pm$ 1.81	4.30 $\pm$ 1.70	2.50 $\pm$ 0.67 ^{b,**}
3. ความตระหนักเกี่ยวกับทางเลือกใหม่ที่ใช้ทดแทนสารกำจัดศัตรูพืช (2r ^c , 8, 9, 10)	10.00 $\pm$ 1.70	10.45 $\pm$ 1.99	10.08 $\pm$ 2.47	13.20 $\pm$ 3.94	11.08 $\pm$ 1.44

^a ใช้ Paired Samples t Test ทดสอบเปรียบเทียบกับก่อนการอบรม

^b ใช้ Paired Samples t Test เปรียบเทียบกับภายหลังการอบรมทันที

^c Reverted scale

* $P<0.05$

** $P<0.005$

5.5 ภูมิคุ้มกันพืชทางด้านชีวเคมีในแต่ pathosystem ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

5.5.1 pathosystem ระหว่าง *Sclerotium rolfsii* และ มะเขือเทศ

5.5.1.1 โรคโคนเน่ากับมะเขือเทศ

ภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน เส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญเข้าชิดด้านข้างของลำต้นมะเขือเทศทุกต้น พบว่าเส้นใยเชื้อราเจริญอย่างรวดเร็วขึ้นไปยังลำต้นด้านบนของมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control ในขณะที่ลำต้นด้านข้างของมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเส้นใยของเชื้อราเจริญเข้ามาชิดแต่ยังไม่ได้แผ่ขยายไปยังบริเวณอื่นของลำต้น (ภาพที่ 16) ต่อมาเนื้อเยื่อของมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control ตรงบริเวณที่ติดกับเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะยุบตัวลึกเข้าไปยังบริเวณ cortex ของพืชภายหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน บางต้นแสดงอาการเป็นคอคอดล้อมรอบลำต้น แต่ต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR นั้นแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบางส่วนและยุบเข้าไปยัง cortex ของพืชเล็กน้อย (ภาพที่ 17) มะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control ทั้งสองการทดลองแสดงอาการเหี่ยวประมาณ 58-66% ภายหลังปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน และทุกต้นแสดงอาการเหี่ยวในอีก 2 วันต่อมา ในขณะที่มะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures แสดงอาการเหี่ยวเพียง 25-33% ภายหลังปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน และมีจำนวนต้นที่แสดงอาการเหี่ยวเพิ่มเป็น 50-58% ภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว 6 วัน จากผลการทดลอง พบว่ามะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ต้านทานต่อโรคโคนเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. rolfsii* อย่างมีนัยสำคัญ 57% และ 42-50% ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม (ภาพที่ 18 และ ตารางที่ 13)

ภาพที่ 16 เส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เจริญเข้าชิดลำต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีควบคุม (ภาพซ้าย) และต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (ภาพขวา) ภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน



ภาพที่ 17 ลำต้นด้านล่างของมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control แสดงอาการยุบตัวของเนื้อเยื่อเป็นคอ คอดเข้าไปยังบริเวณชั้น cortex ของพืช (ภาพซ้าย) เปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ที่แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อบางส่วนซึ่งลึกเข้าไปยังชั้น cortex เล็กน้อย (ภาพขวา) ภายหลังจาก ปลุกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 3 วัน



ภาพที่ 18 อาการเหี่ยวปรากฏเริ่มแรกบริเวณใบยอดของต้นมะเขือเทศภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 4 วัน (ภาพซ้าย) ต้นที่อ่อนแอแสดงอาการเหี่ยวอย่างรวดเร็วทั่วทั้งต้นพืช (ต้นซ้ายมือของภาพด้านขวา) เปรียบเทียบกับต้นที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii* (ต้นด้านขวามือ) ภายหลังการปลูกเชื้อ 6 วัน



ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเชื้อ PGPR mixtures ในการกระตุ้นมะเขือเทศต้านทานโรคโคนเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 5 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ

กรรมวิธี ^u	จำนวนต้นที่เหี่ยว			จำนวนต้นที่เหี่ยว		
	ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน ^w			ภายหลังการปลูกเชื้อ 6 วัน		
	Exp#1	Exp# 2	ค่าเฉลี่ย ^x	Exp#1	Exp# 2	ค่าเฉลี่ย
กรรมวิธี challenge control	10	9	9.5 a	12	12	12.0 a
IN937a+IN937b ^v	5	4	4.5 b	6	7	6.5 b
กรรมวิธี non-challenge control	0	0	0.0 c	0	0	0.0 c
LSD _{0.01}			4.05			4.05

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=*B. subtilis*

^wปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศโดยนำชิ้นอาหารวุ้น PDA ขนาด 1.5 ซม.X 1.5 ซม. ที่มีเชื้อรา *S. rolfsii* อายุ 4-5 วัน ชิดกับลำต้นด้านล่างของพืช ต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นนับเป็นต้นที่เป็นโรค

^xเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยวจากทั้งสองการทดลอง ซึ่งตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.01$

5.5.1.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

โดยธรรมชาติพบว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control มีกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase และ total SOD ในปริมาณระดับหนึ่งและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามอายุของพืช ก่อนทำการปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* ให้กับพืชมะเขือเทศพบว่ามะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับสายพันธุ์ IN937b) ส่วนใหญ่มีกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase และ total superoxide dismutase (total SOD) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control และ non-challenge control ทั้งสองการทดลอง ในขณะที่มะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองใกล้เคียงกับมะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control

กิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase และ total SOD ของมะเขือเทศทั้งในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures และกรรมวิธี challenge control ส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* 12-48 ชั่วโมงตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control โดยทั่วไปแล้ว มะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase มากกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$) ทั้งสองการทดลอง

ประมาณ 18-20% 40-50% และ 16-18% ภายหลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง 36 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 14) สำหรับกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD นั้นพบว่ามะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ดังกล่าวมากกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$) ทั้งสองการทดลองประมาณ 17-36% 28% 32-39% และ 28-36% ภายหลังการปลูกเชื้อ 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 36 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase ของมะเขือเทศช่วงระหว่าง 0-48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม ^w total peroxidase ที่ 0 HAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 12 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 24 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 36 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 48 HAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^y	13.27 a ^y	13.77 a	15.62 a	18.17 a	15.84 a	21.34 a	49.68 a	56.68 a	71.88 a	76.88 a
Challenge control	11.43 b	12.93 a	12.64 ab	16.14 b	12.89 b	16.89 b	24.43 b	33.93 b	50.45 b	63.95 b
Non-challenge control	11.42 b	12.22 a	10.75 b	13.25 c	10.39 c	13.39 b	10.92 c	14.67 c	14.05 c	15.09 c
LSD _{0.05}	0.55	2.93	4.63	1.56	1.90	4.25	3.51	4.02	6.18	8.48

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^yสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=*B. subtilis*

^wวัดกิจกรรม total peroxidase จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein/min

^xHAC หมายถึง ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ P ≤ 0.05

ตารางที่ 15 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total superoxide dismutase ในมะเขือเทศในช่วงระหว่าง 0-48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ^v ที่ 0 HAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 12 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 24 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 36 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 48 HAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^v	31.45 a ^y	32.45 a	62.81 a	71.81 a	64.04 a	75.54 a	72.05 a	85.62 a	73.45 a	88.45 a
Challenge control	28.35 b	27.05 b	41.84 b	45.84 b	46.02 b	53.77 b	43.93 b	58.01 b	46.85 b	63.57 b
Non-challenge control	27.15 b	24.90 b	31.09 c	30.59 b	30.64 c	32.64 c	32.80 c	33.50 c	33.36 c	36.36 c
LSD _{0.05}	1.70	4.80	6.70	17.53	4.95	8.01	4.48	17.40	10.32	6.55

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=*B. subtilis*

^wวัดกิจกรรม total SOD จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein

^xHAC หมายถึง ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

5.5.2 pathosystem ระหว่าง *Sclerotium rolfsii* และ พริกชี้ฟ้า

5.5.2.1 โรคโคนเน่ากับพริกชี้ฟ้า

เส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญชีวิตลำต้นพริกชี้ฟ้าทุกต้นภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน เนื้อเยื่อของลำต้นพริกชี้ฟ้าทั้งกรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ซึ่งติดกับเส้นใยของเชื้อรายังคงมีสภาพเป็นปกติ อย่างไรก็ตามภายหลังการติดเชื้อในวันที่ 2 นั้นพบว่าเนื้อเยื่อพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control ที่ติดกับเส้นใยเชื้อราแสดงอาการ necrosis ขยายเป็นวงกว้างออกไปจากบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย และใบล่างบางส่วนมีลักษณะลู่ลงมา ในขณะที่บริเวณดังกล่าวของลำต้นพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อพืชเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพที่ 19) ต่อมาพบว่าต้นพริกชี้ฟ้าหลายต้นในกรรมวิธี challenge control แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นทางยาวสูงขึ้นไปยังลำต้นด้านบนของพริกชี้ฟ้าอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะด้านที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย แต่เนื้อเยื่อลำต้นของด้านตรงกันข้ามยังเป็นปกติดี ใบล่างส่วนใหญ่มีลักษณะลู่ลงมา อีกทั้งก้านใบบริเวณลำต้นด้านล่างหลุดออกมาจากต้นพืชบางต้น (ภาพที่ 20) ในขณะที่ลำต้นด้านล่างของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ที่ด้านทานโรคมีพัฒนาการของอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นไปอย่างช้าๆและใบพริกชี้ฟ้ายังคงแผ่ขยายเป็นปกติดี

จากการทดลองพบว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control ทั้งสองการทดลองแสดงอาการเหี่ยวประมาณ 66-75% ภายหลังการปลูกเชื้อ 4 วัน โดยที่ใบส่วนใหญ่มีสีซีดเหลืองลู่ลงมาแนบลำต้น และทุกต้นแสดงอาการเหี่ยวในอีก 2 วันต่อมา ในขณะที่พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures เกิดโรคเพียง 16-25% เท่านั้น และจำนวนต้นที่แสดงอาการเหี่ยวเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยที่พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ประมาณ 54.5% และ 42% ภายหลังปลูกเชื้อ 5 และ 6 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในกรรมวิธี challenge control (ภาพที่ 21 และตารางที่ 16)

ภาพที่ 19 อาการตายของเนื้อเยื่อเป็นวงกว้างของลำต้นพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control ภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 2 วัน (ภาพซ้าย) ในขณะที่ต้นพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อเล็กน้อยบริเวณที่ติดกับเชื้อรานั้น (ภาพขวา)



ภาพที่ 20 อาการตายของเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นด้านล่างเป็นทางยาวขึ้นไปยังลำต้นด้านบนของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control (ภาพซ้าย) ก้านใบที่กำลังหลุดออกจากลำต้นพริกชี้ฟ้า (ภาพกลาง) และ ก้านใบส่วนล่างของลำต้นที่หลุดออกไปแล้ว (ภาพขวา) ภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 4 วัน



ภาพที่ 21 จำนวนต้นพริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการเหี่ยวในกรรมวิธี challenge control (กระบะซ้าย) เปรียบเทียบกับจำนวนต้นพริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการเหี่ยวในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (กระบะขวา) ภายหลังจากปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 6 วัน



ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อ PGPR mixtures ในการกระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานโรคโคนเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* 5 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ

กรรมวิธี ^u	จำนวนต้นที่เหี่ยว			จำนวนต้นที่เหี่ยว		
	ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน ^v			ภายหลังการปลูกเชื้อ 6 วัน		
	Exp#1	Exp#2	ค่าเฉลี่ย ^x	Exp#1	Exp#2	ค่าเฉลี่ย
กรรมวิธี challenge control	11	11	11.0 a	12	12	12.0 a
IN937a+IN937b ^v	4	5	4.5 b	6	7	6.5 b
กรรมวิธี non-challenge control	0	0	0.0 c	0	0	0.0 c
LSD _{0.01}			4.05			4.05

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b= *B. subtilis*

^wปลูกเชื้อให้กับพริกชี้ฟ้าโดยนำชิ้นอาหารวุ้น PDA ขนาด 1.5 ซม.X 1.5 ซม. ที่มีเชื้อรา *S. rolfsii* อายุ 4-5 วัน ซิดกับลำต้นด้านล่างของพืช ต้นพริกที่แสดงอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นพืชถือเป็นต้นที่เป็นโรค

^xเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นพริกชี้ฟ้าที่แสดงอาการเหี่ยวจากทั้งสองการทดลอง ซึ่งตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.01$

5.5.2.2 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

จากผลการทั้งสองการทดลองพบว่าพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีการตอบสนองต่อการเพิ่มของกิจกรรมเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดคล้ายกับ pathosystem ของมะเขือเทศ/*S. rolfii* โดยมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ total peroxidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 19-26% (ตารางที่ 17) และ มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ total SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 26-28% (ตารางที่ 18) ภายหลังการปลูกเชื้อ 12 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control ในขณะที่พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control เริ่มมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ total peroxidase มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองการทดลองภายหลังการปลูกเชื้อ 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 17) และมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ total SOD แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในบางการทดลองภายหลังการปลูกเชื้อ 12-48 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control (ตารางที่ 18)

โดยทั่วไปแล้วกิจกรรมเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control ภายหลังการปลูกเชื้อ 24-48 ชั่วโมง ซึ่งพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมเอ็นไซม์ total peroxidase มากกว่าประมาณ 18-20% 40-50% และ 16-18% (ตารางที่ 3) และมีกิจกรรมเอ็นไซม์ total superoxide dismutase มากกว่าประมาณ 28% 32-39% และ 28-36% (ตารางที่ 4) ตามลำดับ

พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี non-challenge control มีกิจกรรมเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดขึ้นๆลงๆ ตลอดระยะเวลาของการทดลอง

ตารางที่ 17 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase ของพริกชี้ฟ้าช่วงระหว่าง 0-48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ^v ที่ 0 HAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 12 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 24 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 36 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 48 HAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^v	19.66 a	21.66 a	22.44 a ^y	25.59 a	27.95 a	31.65 a	33.22 a	37.02 a	44.09 a	47.43 a
Challenge control	18.69 a	20.69 a	20.00 a	22.82 ab	20.49 b	24.29 b	23.80 b	27.59 b	26.30 b	33.51 b
Non-challenge control	17.31 a	18.96 a	16.57 b	20.62 b	16.58 c	20.19 b	16.90 c	20.40 c	15.60 c	21.30 c
LSD _{0.05}	3.59	4.32	2.74	3.02	4.66	5.07	3.47	3.17	7.46	8.87

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=B. *subtilis*

^wวัดกิจกรรม total peroxidase จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein/min

^xHAC หมายถึง ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

ตารางที่ 18 ผลของ PGPR mixtures ในการกระตุ้นการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total superoxide dismutase ในพริกชี้ฟ้าก่อนและหลังการปลูกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ^v ที่ 0 HAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 12 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 24 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 36 HAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total SOD ที่ 48 HAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^y	23.19 a	24.12 a	29.54 a ^y	31.89 a	31.55 a	34.50 a	32.61 a	39.75 a	42.62 a	46.33 a
Challenge control	22.57 a	23.52 a	24.79 b	24.53 b	25.30 b	27.58 b	25.77 b	31.32 b	26.05 b	34.85 b
Non-challenge control	22.07 a	22.44 a	21.22 c	23.50 b	22.72 b	23.36 c	22.44 b	23.29 c	21.76 b	23.17 c
LSD _{0.05}	2.45	2.47	2.68	4.39	2.89	2.99	3.66	6.21	5.41	9.05

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^yสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=B. *subtilis*

^vวัดกิจกรรม total SOD จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg . protein

^xHAC หมายถึง ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

5.5.3 pathosystem ระหว่าง *Ralstonia solanacearum* และ มะเขือเทศ

5.5.3.1 โรคเหี่ยวเหี่ยวกับมะเขือเทศ

อาการเหี่ยวเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ปรากฏชัดกว่ามะเขือเทศที่ถูกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เข้าทำลาย จากผลการทดลองทั้งสองครั้ง พบว่า มะเขือเทศบางต้นเริ่มปรากฏอาการใบเหี่ยวบริเวณด้านล่างของลำต้น ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ภาพที่ 22) อย่างไรก็ตามมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control มีพัฒนาการของอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นพืชอย่างรวดเร็วในระยะเวลาต่อมา อีกทั้งทุกต้นแสดงอาการเหี่ยวทั่วทั้งต้นภายใน 3 วันต่อมา ในขณะที่ต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพียง 50-58% ของทั้งสองการทดลอง (ภาพที่ 23 และ ตารางที่ 19)

ภาพที่ 22 อาการเหี่ยวเฉาปรากฏเริ่มแรกบริเวณใบด้านล่าง (ลูกศรชี้) ของพืชมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control ภายหลังจากการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* 7 วัน



ภาพที่ 23 อาการเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control (แถวซ้าย) เปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ภายหลังการปลูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* 10 วัน



ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพของ PGPR mixtures ในการกระตุ้นมะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเฉาที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* 7 วัน และ 10 วันตามลำดับ

กรรมวิธี ^u	จำนวนต้นที่เหี่ยว			จำนวนต้นที่เหี่ยว		
	ภายหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ^v			ภายหลังการปลูกเชื้อ 10 วัน		
	Exp# 1	Exp# 2	ค่าเฉลี่ย ^x	Exp# 1	Exp# 2	ค่าเฉลี่ย
กรรมวิธี challenge control	3	2	2.5 a	12	12	12.0 a
IN937a+IN937b ^v	1	0	0.5 b	7	5	6.0 b
กรรมวิธี non-challenge control	0	0	0.0 c	0	0	0.0 c
LSD _{0.05}			1.75			3.51

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b= *B. subtilis*

^xปลูกเชื้อให้กับพืชโดยใช้มีดแทงลงไปบน soilless peat ที่ห่างจากลำต้นมะเขือเทศประมาณ 5 เซนติเมตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เกิดบาดแผลบริเวณรากของมะเขือเทศ ก่อนราดสารแขวนลอย *R. solanacearum* ที่มีความเข้มข้น 10^8 cells/ml ปริมาตร 50 ml ต่อกระถาง

^yเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนต้นที่แสดงอาการเหี่ยวทั้งสองการทดลอง ซึ่งตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

5.5.3.2 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

จากผลการทดลองทั้งสองครั้งพบว่า ภายหลังการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* 1 วัน มะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures และมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control มีกิจกรรมเอ็นไซม์ total peroxidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี non-challenge control อย่างไรก็ตามมะเขือเทศที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมเอ็นไซม์ total peroxidase มากกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control อย่างมีนัยสำคัญประมาณ 12-14% 25% และ 20-28% ภายหลังการปลูกเชื้อ 4 วัน 7 วัน และ 10 วันตามลำดับ

แม้ว่าภายหลังการปลูกเชื้อ 4 วันกิจกรรมของเอ็นไซม์ดังกล่าวกลับลดลงตามลำดับ มะเขือเทศทั้งสองกรรมวิธียังคงมีระดับของกิจกรรมที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี non-challenge control มะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมเอ็นไซม์ total peroxidase ลดลงอย่างช้าๆประมาณ 8-10% ในช่วงระหว่างวันที่ 4 ถึงวันที่ 7 ของการปลูกเชื้อ ในขณะที่กิจกรรมเอ็นไซม์ของมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control ลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 21-22% สำหรับในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 ภายหลังการปลูกเชื้อพบว่ามะเขือเทศทั้งสองกรรมวิธีดังกล่าวมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 20)

กิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD ของมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธี challenge control และ non-challenge control ในขณะที่มะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control มีกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมากกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control อย่างมีนัยสำคัญภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน มะเขือเทศในกรรมวิธี PGPR mixtures ยังคงมีการเพิ่มของกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการปลูกเชื้อ 1-10 วันเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD ของมะเขือเทศทั้งสองกรรมวิธีคือ PGPR mixtures และ challenge control กลับลดลงในวันที่ 10 ภายหลังการปลูกเชื้อ แต่มะเขือเทศที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD น้อยกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control (ตารางที่ 21)

มะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control มีกิจกรรมเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดขึ้นๆลงๆตลอดระยะเวลาของการทดลอง

ตารางที่ 20 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase ของมะเขือเทศช่วงระหว่าง 0-10 วันภายหลังการปลูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ^w ที่ 0 DAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 1 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 4 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 7 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 10 DAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^y	13.63 a	13.32 a	32.51 a ^y	36.39 a	65.95 a	70.74 a	60.48 a	63.32 a	40.49 a	47.17 a
Challenge control	11.55 a	12.18 a	27.56 a	30.76 a	57.52 b	60.77 b	44.95 b	47.35 b	32.35 b	33.97 b
Non-challenge control	11.31 a	11.86 a	12.06 b	13.12 b	11.97 c	13.05 c	12.12 c	13.59 c	11.38 c	14.33 c
LSD _{0.05}	3.39	2.36	8.95	6.38	4.28	4.11	3.45	2.99	5.98	7.07

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^yสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=*B. subtilis*

^wวัดกิจกรรม total peroxidase จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein/min

^xDAC หมายถึง วันภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ P ≤ 0.05

ตารางที่ 21 ผลของ PGPR mixtures ที่มีการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total superoxide dismutase ของมะเขือเทศช่วงระหว่าง 0-10 วันภายหลังการปลูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม	
	total SOD ^y ที่ 0 DAC ^x		total SOD ที่ 1 DAC		total SOD ที่ 4 DAC		total SOD ที่ 7 DAC		total SOD ที่ 10 DAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^y	41.00 a	45.22 a	61.59 a ^y	65.29 a	110.89 a	120.60 a	164.94 a	171.53 a	104.5 a	116.06 a
Challenge control	40.76 a	45.12 a	41.71 b	46.71 b	97.25 b	104.52 b	139.04 b	147.58 b	75.79 b	96.43 b
Non-challenge control	40.47 a	44.54 a	39.35 b	42.56 b	40.76 c	43.77 c	40.73 c	46.35 c	40.75 c	45.34 c
LSD _{0.05}	5.68	6.25	4.16	6.65	4.50	9.76	8.19	5.31	19.88	9.29

^yรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^xสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=B. *subtilis*

^wวัดกิจกรรม total SOD จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein

^xDAC หมายถึง วันภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ P ≤ 0.05

5.5.4 pathosystem ระหว่างเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และ พริกชี้ฟ้า

5.5.4.1 โรคแอนแทรคโนสของพริกชี้ฟ้า

ผลพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control ปรากฏแผลสีน้ำตาลหลายจุดมีลักษณะยุบตัวลงไปบนเนื้อเยื่อบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายเล็กน้อยภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน ต่อมาแต่ละแผลที่อยู่ใกล้เคียงกันได้ขยายตัวและรวมเป็นแผลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ผลพริกชี้ฟ้ามีลักษณะบิดเบี้ยวและงอตัว ในขณะที่ผิวของผลพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures เกิดอาการจุดตายของเนื้อเยื่อสีน้ำตาลเพียงเล็กน้อยตรงบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย และแผลมีพัฒนาการของการขยายตัวเป็นไปอย่างช้า

จากผลการทดลองทั้งสองครั้งพบว่า พริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ประมาณ 60% และ 42% ภายหลังการปลูกเชื้อ 10 วัน และ 14 วันตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control (ภาพที่ 24 และ ตารางที่ 22)

ภาพที่ 24 ความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control (กลุ่มผลพริกต้นซ้ายมือ) เปรียบเทียบกับความรุนแรงที่เกิดขึ้นกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (กลุ่มผลพริกต้นขวามือ) ภายหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 14 วัน



ตารางที่ 22 ประสิทธิภาพของเชื้อ PGPR mixtures ในการกระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานโรคแอนแทรคโนส ภายหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 10 วัน และ 14 วันตามลำดับ

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค ภายหลังการปลูกเชื้อ ^v 10 วัน			ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค ภายหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน		
	ค่าเฉลี่ย Exp#1	ค่าเฉลี่ย Exp#1	ค่าเฉลี่ยของ ทั้งสองการ ทดลอง ^x	ค่าเฉลี่ย Exp#1	ค่าเฉลี่ย Exp#1	ค่าเฉลี่ยของ ทั้งสองการ ทดลอง ^z
กรรมวิธี challenge control	32.50	35.00	33.75 a	65.0	67.5	66.25 a
IN937a+IN937b ^v	11.50	16.00	13.75 b	37.5	40.0	38.75 b
กรรมวิธี non- challenge control	0	0	0.00 c	0	0	0.00 c
LSD _{0.05}			6.76			10.32

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b= *B. subtilis*

^wปลูกเชื้อให้กับพืชโดยฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล) ให้ทั่วผลพริกชี้ฟ้าทุกผลจนกระทั่ง run-off เก็บต้นพืชไว้ในตู้ที่บ่มแสงที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 85-90% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

^xเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกชี้ฟ้าจากทั้งสองการทดลอง ซึ่งตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

5.5.4.2 เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

กิจกรรมเอ็นไซม์ total peroxidase ของมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures และมะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศในกรรมวิธี non-challenge control ภายหลังการปลูกเชื้อ 1-10 อีกทั้งมะเขือเทศในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีกิจกรรมของเอ็นไซม์มากกว่ามะเขือเทศในกรรมวิธี challenge control อย่างมีนัยสำคัญ อย่างน้อยที่สุดประมาณ 37% ตลอดระยะเวลาภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน 4 วัน 7 วัน และ 10 วัน (ตารางที่ 23)

สำหรับกิจกรรมเอ็นไซม์ total SOD ของพริกชี้ฟ้าใน pathosystem นี้มีลักษณะคล้ายกับ pathosystem ของพืชมะเขือเทศ และเชื้อ *R. solanacearum* โดยที่กิจกรรมเอ็นไซม์ดังกล่าวของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures และกรรมวิธี challenge control เพิ่มขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ แต่กลับลดลงที่ลดลงภายหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน และ 10 วัน ตามลำดับเช่นกัน อย่างไรก็ตามพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ยังคงมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญประมาณ 10-24% ขึ้นอยู่กับแต่

ละการทดลองและแต่ละช่วงเวลาภายหลังการปลูกเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี challenge control (ตารางที่ 24)

กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองของพริกชี้ฟ้าในกรรมวิธี non-challenge control มีลักษณะ ขึ้นๆลงๆ ตลอดระยะเวลาของการทดลอง

ตารางที่ 23 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total peroxidase ในพริกชี้ฟ้าช่วงระหว่าง 0-10 วันภายหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

กรรมวิธี ^u	ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase* ที่ 0 DAC ^x		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 1 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 4 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 7 DAC		ค่าเฉลี่ยกิจกรรม total peroxidase ที่ 10 DAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^v	2.13 a	2.89 a	7.60 a ^y	8.49 a	10.03 a	11.79 a	10.22 a	14.27 a	13.29 a	16.10 a
Challenge control	1.99 a	2.63 a	4.81 b	5.53 b	4.91 b	6.23 b	4.84 b	7.18 b	8.36 b	9.58 b
Non-challenge control	1.94 a	2.59 a	1.96 c	2.85 c	1.94 c	3.05 c	1.86 c	3.34 c	2.31 c	3.31 c
LSD _{0.05}	0.67	0.89	0.31	1.20	0.52	2.52	0.32	2.41	1.14	2.16

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=*B. subtilis*

^wวัดกิจกรรม total peroxidase จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein/min

^xDAC หมายถึง วันภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

ตารางที่ 24 ผลของ PGPR mixtures ที่มีต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ total superoxide dismutase ในพริกชี้ฟ้าช่วงระหว่าง 0-10 วันภายหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

Treatment	Mean total SOD activity at 0 DAC		Mean total SOD activity at 1 DAC		Mean total SOD activity at 4 DAC		Mean total SOD activity at 7 DAC		Mean total SOD activity at 10 DAC	
	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2	Exp#1	Exp#2
PGPR mixtures ^v	3.62 a	4.58 a	4.77 a ^y	6.69 a	6.05 a	7.65 a	4.98 a	6.78 a	4.58 a	5.95 a
Challenge control	3.50 a	4.50 a	4.31 b	5.19 b	4.58 b	5.86 b	4.33 b	5.49 b	3.59 b	5.09 b
Non-challenge control	3.35 a	3.98 a	3.25 c	4.21 c	3.02 c	4.08 c	3.24 c	4.44 b	3.09 c	4.09 c
LSD _{0.05}	0.27	1.36	0.23	0.73	0.12	0.54	0.25	1.09	0.11	0.84

^uรูปแบบการทดลองคือ Factorial with randomized complete block ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี non-challenge control กรรมวิธี challenge control และกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR IN937a+IN937b แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง

^vสายพันธุ์ IN937a= *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937b=B. *subtilis*

^wวัดกิจกรรม total SOD จากโปรตีนรวมที่สกัดจากตัวอย่างพืชอย่างน้อยซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยมีหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เป็น Units/mg. protein

^xDAC หมายถึง วันภายหลังการปลูกเชื้อ

^yตัวอักษรที่แตกต่างกันหลังตัวเลขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ least significant difference ที่ $P \leq 0.05$

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาต่อเนื่องสองปีในพื้นที่เกษตรกรหลายพื้นที่ซึ่งมีคุณสมบัติของดินแตกต่างกัน ได้ชี้ให้เห็นว่า PGPR mixtures (สายพันธุ์ IN937a+IN937b) ส่วนใหญ่สามารถควบคุมโรคหลากหลายชนิดที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติซึ่งรวมถึงโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* โรคใบม้วนเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* โรคเหี่ยวเฉียวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* โรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*, และ โรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* ได้อย่างสม่ำเสมอตลอดฤดูกาลปลูก จากการศึกษาในแปลงเกษตรกรปีแรกพบว่า พืชที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures ส่วนใหญ่มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคหรือจำนวนต้นที่ติดเชือน้อยกว่าพืชที่กระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบางฤดูกาลพบว่ามะเขือเทศและพริกชี้ฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีความรุนแรงของโรคใบเหลืองม้วนและมีจำนวนต้นที่ติดเชื้อโรคใบด่างตามลำดับ น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a อย่างเดียว อีกทั้งตรวจพบว่าบางพื้นที่ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีจำนวนต้นที่ติดเชื้อโรคใบด่างน้อยกว่าแปลงที่ปลูกพืชที่ถูกกระตุ้นด้วย PGPR สายพันธุ์ IN937a เพียงอย่างเดียว สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่เข้ากันได้โดยทั่วไปแล้วมักเพิ่มการป้องกันโรคและมีประสิทธิภาพที่สม่ำเสมอกว่าการใช้เพียงจุลินทรีย์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง นอกจากนี้การใช้ PGPR ร่วมกันมีความใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติที่ซึ่งจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดทำงานร่วมกันทำให้กิจกรรมการควบคุมโรคโดยชีววิธีมีขอบข่ายที่กว้างขึ้นและมีประสิทธิภาพควบคุมโรคที่สม่ำเสมอ ในขณะที่การใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการควบคุมไม่คงที่เนื่องจากการปรับตัวที่มีลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในสิ่งแวดล้อมใดสิ่งแวดล้อมหนึ่งมีความแตกต่างกัน

แม้ว่าผลการทดลองของพริกชี้ฟ้าช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2547 ในพื้นที่ A และ B ไม่สามารถเก็บข้อมูลได้เนื่องจากพืชถูกแมลงศัตรูพืชทำลายก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงก็ตาม แต่การทดลองในพื้นที่ C และพื้นที่ E ที่ศึกษาในปีที่สองทั้งสองฤดูกาลนั้นพบว่า PGPR mixtures สามารถกระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อชนิดเดียวกันในพื้นที่ A ช่วงฤดูหนาว พ.ศ. 2546 คือ Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ใส่ PGPR นอกจากนี้ PGPR mixtures ยังช่วยยับยั้งการเกิดโรคโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าซึ่งเป็นโรครองในพื้นที่ E ทั้งสองฤดูกาลได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน อีกทั้ง PGPR mixtures ยังช่วยยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวเฉียวซึ่งเป็นโรคหลักในพื้นที่ D ในช่วงฤดูหนาว พ.ศ. 2547 และโรคเหี่ยวเฉียวที่เป็นโรครองในพื้นที่ C ในช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2548 ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน จากการศึกษาของผู้วิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับ *in vitro* antibiosis ในห้องปฏิบัติการพบว่า PGPR สายพันธุ์ IN937a และ สายพันธุ์ IN937b ไม่ผลิตสารปฏิชีวนะใดๆที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* เชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และเชื้อ *Rhizoctonia solani* (Jetiyanon and Kloepper, 2002) และไม่มีผลด้าน *in vitro* antibiosis ต่อเชื้อ

S. rolfii (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากลไกการควบคุมโรคที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ PGPR สายพันธุ์ IN937a และสายพันธุ์ IN937b ที่มีต่อเชื้อสาเหตุโรคในดินอาจไม่เกี่ยวข้องกับกลไกด้าน antagonism ทำให้แปลผลข้อมูลได้ว่า PGPR mixtures (สายพันธุ์ IN937a ร่วมกับ IN937b) สามารถกระตุ้นพริกชี้ฟ้าต้านทานโรคหลายชนิดซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ TYLCV เชื้อ *S. rolfii* และเชื้อ *R. solanacearum* ในหลายพื้นที่ด้วยประสิทธิภาพการควบคุมโรคที่สม่ำเสมอ

โดยทั่วไปแล้วพืชแดงกวาที่ศึกษาในแปลงเกษตรกรปีที่สองในพื้นที่ C D และ E พบว่าแดงกวาทั้งสามพื้นที่ในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures มีความรุนแรงของโรคน้ำค้างทั้งสองฤดูกาลน้อยกว่าแดงกวาในกรรมวิธีควบคุม แม้ว่าเกษตรกรแต่ละรายได้ฉีดพ่นสารฆ่าโรคในกรรมวิธีควบคุมในช่วงที่โรคปรากฏก็ตาม สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า PGPR mixtures มีศักยภาพในการควบคุมโรคน้ำค้างได้ในระดับเดียวกันหรือในระดับที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อราที่ใช้ในแปลงควบคุม ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า PGPR mixtures มีศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคได้หลากหลายชนิดในพื้นที่ซึ่งมีสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันอีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมที่สม่ำเสมอ

เอ็นไซม์ peroxidase ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อเป็นแหล่งผลิต active oxygen (AO) ซึ่งรวมถึง superoxide anions (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ที่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพลาสมาของพืชทำให้เกิดการออกซิเดชันของเนื้อเยื่อไขมันที่จำเป็น ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์พืช เกิดการแห้งอย่างรวดเร็ว และเซลล์พืชตายในที่สุด อย่างไรก็ตามพืชมีเอ็นไซม์อีกชนิดหนึ่งคือ superoxide dismutase (SOD) ที่ช่วยลดความเป็นพิษของ O_2^- และเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืชที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค เมื่อศึกษากลไกป้องกันตนเองของพืชที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures (สายพันธุ์ IN937a+IN937b) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อทั้ง 4 pathosystems คือ มะเขือเทศ/*S. rolfii* พริกชี้ฟ้า/*S. rolfii* มะเขือเทศ/*R. solanacearum* และพริกชี้ฟ้า/*Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าพืชทุก pathosystem มีการเพิ่มของเอ็นไซม์ peroxidase และ เอ็นไซม์ SOD ในลักษณะที่คล้ายกัน กล่าวคือกิจกรรมเอ็นไซม์ peroxidase และ SOD ส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระดับที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับพืชในกรรมวิธี challenge control นอกจากนี้แม้ว่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ดังกล่าวจะลดลงในระยะเวลาต่อมาใน pathosystem ของมะเขือเทศ/*R. solanacearum* และพริกชี้ฟ้า/*Colletotrichum gloeosporioides* แต่กิจกรรมเอ็นไซม์ดังกล่าวของพืชในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures ยังคงมีอยู่ในระดับที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่ช้ากว่าในกรรมวิธี challenge control ผลของเอ็นไซม์เหล่านี้สอดคล้องกับจำนวนต้นที่ติดเชื้อหรือเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในกรรมวิธีที่กระตุ้นด้วย PGPR mixtures และกรรมวิธี challenge control ทั้งสองการทดลองในสภาพเรือนทดลอง อีกทั้งการศึกษานี้ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า PGPR mixtures อย่างน้อยที่สุดสามารถกระตุ้นการเพิ่มที่คล้ายกันของเอ็นไซม์ peroxidase และ SOD กับพืชพริกชี้ฟ้า และมะเขือเทศ ใน pathosystem ที่แตกต่างกัน และได้ชี้ให้เห็นว่าระดับ

เอนไซม์ peroxidase และ SOD โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่อยู่ถัดจากเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อเข้าทำลายที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะแรกของการติดเชื้ออาจมีส่วนช่วยชะลอหรือยับยั้งการเกิดโรคของพืชในระยะเวลาต่อมา

การจัดบรรยาย/อภิปรายและศึกษาดูงานแปลงสาธิต PGPR เป็นเวลา 1 วันโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาความรู้และความตระหนักของเกษตรกรต่อการใช้ PGPR เป็นองค์ประกอบร่วมในการจัดการโรคพืชผักนั้นพบว่า เกษตรกรมีความรู้เกี่ยวกับการจัดการศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างการควบคุมโดยชีววิธีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและความรู้ส่วนใหญ่คงทนจนถึง 6 เดือน อย่างไรก็ตามกิจกรรมที่จัดให้กับเกษตรกรไม่ได้เพิ่มความตระหนักของเกษตรกรในการหาทางเลือกใหม่ทดแทนการใช้สารเคมี ยกเว้นเกษตรกรเกิดความตระหนักมากขึ้นในแง่ของความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้อยู่ นอกจากนี้การจัดกิจกรรมในลักษณะนี้สามารถใช้ได้กับเกษตรกรที่มีพื้นฐานต่างกันในระดับการศึกษา เพศ หรือ อายุ โดยทั่วไปแล้วการได้รับความรู้และความตระหนักเกี่ยวกับนวัตกรรมใหม่จะช่วยให้เกิดกระบวนการยอมรับ ดังนั้นกระบวนการเหล่านี้มีแนวโน้มการเพิ่มโอกาสของความสำเร็จของการแพร่กระจายเทคโนโลยี จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าผู้ที่ประดิษฐ์นวัตกรรมสามารถจัดเตรียมผู้ที่มีแนวโน้มในการยอมรับเทคโนโลยีในช่วงเริ่มต้นได้โดยยังไม่คำนึงถึงระยะการพัฒนาของกระบวนการ และอีกเช่นกันงานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นเพียงระยะเริ่มต้น ซึ่งในขั้นต่อไปผู้วิจัยจะพัฒนาสูตร PGPR ที่สามารถนำไปใช้ได้จริงในพื้นที่เกษตรกรในอนาคต

6. Output ที่ได้จากโครงการ

6.1 Jetiyanon, K., Plianbangchang, P. and Preechaharn, A. (2006). PGPR Mixtures for Plant Disease Protection against Indigenous Diseases at Different Locations. *Biological Control*. (submitted).

6.2 Jetiyanon, K., Plianbangchang, P., and Nimpitakpong, P. (2006). The Effect of Intervention on Knowledge and Awareness of Pest Management and Biological Control Measures among Thai Farmers. *Kaset Journal*. (submitted).

6.3 Jetiyanon, K. (2006). Similarity of Early Defensive Enzymes Induced by PGPR Mixtures in Different Plant/Pathosystems. *Plant Disease* (in preparation).

ภาคผนวก

**PGPR Mixtures for Plant Disease Protection against Indigenous Diseases at
Different Locations**

Kanchalee Jetiyanon^{a,*} Pinyupa Plianbangchang^b and Amornlak Preechaharn^a

^aDepartment of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Natural Resources, and
Environmental Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand.

^bDepartment of Pharmaceutical Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan
University, Phitsanulok, 65000, Thailand

* Corresponding author: K. Jetiyanon Tel. 66-55-261000-4 ext. 2722 Fax. 66-55-
261040

E-mail address: kanchaleej@nu.ac.th (K. Jetiyanon).

Abstract

Previous experiments indicated compatible mixtures of plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains protected plants against multiple diseases during both the rainy and winter seasons. The aim of this study was to conduct on farm investigations the consistency of PGPR-mediated protection against indigenous tropical diseases. In the first study year, winter 2003 and rainy 2004 seasons, the experiments were conducted in two locations in Bungphra District, Muang, Phitsanulok. The specific hosts tested were cucumber (*Cucumis sativus*), pepper (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). In the second year, winter 2004 and rainy 2005 seasons, experiments were performed in three locations in Tapho District and Watprig District, Muang, Phitsanulok. Pepper and cucumber were tested. In the first year, most cucumber and tomato treated with PGPR mixtures (*Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a + *B. pumilis* strain IN937b) showed significant reductions ($P \leq 0.05$) of mosaic disease and yellow leaf curl disease compared to nonbacterized control. Additionally, PGPR mixtures also showed significant suppression against pepper mosaic disease in both locations in winter of 2003. In the second year study, PGPR mixtures significantly suppressed downy mildew disease in cucumber at least two locations and most other indigenous diseases (mosaic, bacterial wilt, and southern blight) on long cayenne pepper in all locations throughout the seasons compared to those in nonbacterized control. Yield enhancement by PGPR mixtures was also observed in both years. In conclusion, compatible PGPR mixtures (IN937a+IN937b) provided broad disease suppression against multiple diseases at different locations.

Keywords: PGPR mixtures; induced systemic resistance; indigenous disease; different grower locations

1. Introduction

Several studies have shown that plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can elicit induced systemic resistance (ISR) against diseases under field conditions (Kloepper et al., 2004; Kokalis-Burelle et al., 2003; Kokalis-Burelle et al., 2002; Raupach and Kloepper 2000; Zehnder et al., 2001). Most of them, however, were aimed at evaluating the disease protection by PGPR against particular diseases in specific crops. Moreover, almost all of the field trials were conducted at public institutional research stations or at private company research farms. To date, there are no reports of on-farm tests of PGPR for protection against multiple indigenous diseases.

In Thailand, a single crop grown naturally in the field may be attacked by combinations of several kinds of diseases during growing season due to favorable tropical conditions for pathogenic infection. Particular soil-borne disease (such as bacterial wilt, southern blight and damping off) or air borne disease (such as anthracnose, mosaic, yellow leaf curl and downy mildew) may dominate as the major disaster on particular vegetable crops resulting in severe loss. Even the same crop cultivated in different locations, the major disease would be different due to the indigenous pathogen in the area.

Our previous demonstration field experiments indicated that one compatible PGPR mixture (*Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a + *B. pumilis* strain IN937b) elicited systemic protection activity against multiple diseases such as cucumber mosaic disease caused by cucumber mosaic virus, tomato southern blight disease caused by *Sclerotium rolfsii*, and long cayenne pepper anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, both in rainy and winter seasons (Jetiyanon et al., 2003). In addition, a single strain of IN937a had only one efficient disease suppression against all those diseases in the rainy season. Based on these results, there is a strong

interest among farmers in Thailand to adopt PGPR technology, and the current project is aimed at moving toward this goal. Specifically, the aim of this study was to investigate whether compatible PGPR mixtures (IN937a+IN937b) could consistently express broad-spectrum protection against indigenous diseases in different on-farm locations. We conducted a study to evaluate PGPR for systemic protection in Phitsanulok, Thailand. Two growers in two different areas participated in the first year of this project, and three in three areas did in the second year.

2. Methodology

2.1. Bacterial cultures

Two PGPR strains used in this study were *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a and *Bacillus pumilus* strain IN937b. They were obtained from the culture collection of the phytobacteriology laboratory of Auburn University (Auburn, Alabama, USA). Mixtures of those two PGPR strains provided consistent broad-spectrum protection against mosaic disease, southern blight disease, and anthracnose disease under experimental field in both rainy and winter seasons, while IN937a alone gave systemic protection against those diseases only in the rainy season (Jetiyanon et al. 2003). In addition, those two mixing strains also significantly suppressed bacterial wilt disease and damping off disease under controlled environment (Jetiyanon and Kloepper, 2002).

The bacteria were maintained in tryptic soy broth (TSB) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) supplemented with 20% glycerol at -80°C for long-term storage. For experimental use, bacteria were transferred into TSB for 24 h. The concentration was then adjusted in sterile distilled water to 10^{11} cells/ml for seed treatment or 10^8 cells/ml for root treatment.

2.2. Examination of soil properties

Soil samplings were randomly collected from each grower's field. Certain chemical and physical properties such as soil textures, soil pH, percentage of organic matter, percentage of total nitrogen, available phosphorus, and available potassium, were analyzed in the laboratory of Natural Resources and Environment Department, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environmental Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

2.3. First Field Year Study

Experiments were conducted in two growers' fields (fields A and B) in Bungphra District, Muang, Phitsanulok, both in winter (November 2003 to February 2004) and rainy seasons (June to September 2004). Both fields were approximately 15 km apart from Naresuan University and previously cultivated vegetables including tomato, cucumber, pepper, green kuang futsoi, chinese kale, and etc. Multiple crops were cultivated in the same area. From personal interview with growers before starting experiments, yellow leaf curl disease was previously a major disease on tomato which sometimes resulted in no yield at the end of the season. This situation caused grower quitting tomato production in that area. Mosaic symptom was a major disease on cucumbers. For pepper plants, the major disease was either anthracnose or mosaic symptom depending on the season. Recently, mosaic symptom is the major problem in this area.

Each location consisted of three experiments, one each for cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Thong), long cayenne pepper (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh cv. 111 CHANYA) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Srida). The

experimental design was a randomized complete block (RCB) with three treatments and five replications. Treatments consisted of a nonbacterized control, individual *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a, and mixtures of *B. amyloliquefaciens* strain IN937a + *B. pumilis* strain IN937b. Plots were 1 m wide by 10 m long. Each plot was separated 1 m, and 18 plants within were spaced at 50 cm. Plots were covered with white polyethylene plastic film. Weeds were periodically eradicated either mechanically or by hand.

Seeds of tested plants were soaked in 100 ml bacterial suspensions (10^{11} cells/ml in total of either PGPR strain IN937a alone or IN937a+IN937b mixtures) maintained in 250-ml flasks and were then incubated in an orbital incubator shaker (100 rpm, Gyromax 707, Amerex Instrument, Lafayette, CA) at 30° C for 60 min. They were planted in a plastic seedling tray containing sterile soilless peat-based medium (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe, Germany). The nonbacterized control was soaked in tryptic soy broth (TSB) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD). All seedling plants were maintained in the greenhouse. Four to five days after seeding, each cucumber plant in the plastic tray was drenched with 10 ml of bacterial suspensions (10^8 cells/ml in total of either PGPR strain IN937a alone or IN937a+IN937b mixtures). At one month after seeding, each tomato and pepper plant in plastic tray was drenched with the same amount of bacterial suspension (10^8 cells/ml). Nonbacterized control plant was drenched with 10 ml of diluted TSB in sterile distilled water (1 ml of TSB in 1.0 liter of sterile distilled water). Plants were transferred to fields A and B in Bungphra District 7 days after soil drench. Liquid fertilizer (16-20-0) was first applied on the transplanting day and 2 weeks after the first application. Liquid fertilizer (7-13-21) was then utilized when plants first began flower set and was applied again 2 weeks later. Each two meter long wood (2 inches in diameter) was used to

support each cucumber plant, while each 1.5 meter long wood was used to support each tomato and long cayenne pepper plant. Insecticide (methamidophos) was applied once or twice during the plant's vegetative growth to avoid the dispersal of insect pest.

2.3.1. Growth and yield of investigating plants

The length of the cucumber main runner of each plant, and the height of tomato and long cayenne pepper plants were recorded one month after transplanting. Marketable cucumber, long cayenne pepper, and tomato fruits were harvested from each treatment until the end of the season. The fruit weight from each treatment was totaled for statistical analysis.

2.3.2. Cucumber mosaic disease

Naturally-occurring mosaic symptom was observed every week after transplanting and was recorded 35 days after transplanting. Disease incidence was recorded as the number of symptomatic showing mosaic symptom on leaves.

2.3.3. Tomato yellow leaf curl disease

Naturally-occurring yellow leaf curl disease was observed every week after transplanting and was rated for disease severity 60 days after transplanting. The number of symptomatic leaves (yellowing and curling leaves) per plant was recorded. Disease severity was calculated as the percentage of symptomatic leaves per plant.

2.3.4. Pepper mosaic disease

All plants were rated for disease incidence of naturally-occurring mosaic symptom approximately two months after transplanting. Disease incidence was recorded as the number of symptomatic plants showing mosaic symptom on leaves.

2.3.5. Identification of the casual agent of naturally-occurring diseases

Infected young leaves of cucumber, tomato, and long cayenne pepper were collected and sent to Plant Genetic Engineering Unit, Kasetsart University, Nakorn Pathom, Thailand for identification of the possible causal agents. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used to identify *Tomato yellow leaf curl virus*, while reverse transcriptase-PCR reaction technique was used to identify *Cucumber mosaic virus*.

2.3.6. Statistical analysis

All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the treatment means were separated by Fisher's protected least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$. All statistical analyses were performed on SAS software (SAS Institute, Gary, NC, USA).

2.4. Second Field Year Study

The study protocol was approved by Naresuan University Institutional Review Board prior to the beginning of the study. Consent forms were obtained from all participating growers. In winter (November 2004 to February 2005), experiments were conducted in two fields (fields C and D) in Watprig District and one field (field E) in Tapho District, Muang, Phitsanulok. However, in rainy season (June to September

2005), one grower (field D) in Watprig District withdrew from our project due to personal reasons, leaving two growers (fields C and E) in the experiments.

Tapho District and Watprig District were approximately 2 km and 20 km apart from Naresuan University, respectively. From personal interview with growers in each location, these two districts previously cultivated cucumber and long cayenne pepper as the major vegetable crops. Downy mildew is the major disease on cucumber in all locations. Mosaic symptom is a major disease on long cayenne pepper in fields C and E, while bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* and southern blight disease caused by *Sclerotium rolfsii* always occur as a minor disease in fields C and E, respectively. However, bacterial wilt disease is the only major disaster on long cayenne pepper in field D resulting in little or no yield at the end of the season. Only two specific hosts, long cayenne pepper (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh cv. 111 CHANYA) and cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Thong), were tested. Since PGPR mixtures (strains IN937a+IN937b) gave more consistent performance of disease suppression in the first year compared to individual IN937a strain, they were selected for testing their ISR ability in this year. There were two experiments (one for long cayenne pepper and one for cucumber) in each location. The experimental design in each grower's field was randomized of treatments. Treatments consisted of nonbacterized control with each grower's traditional practices and plant induced by mixtures of PGPR (strains IN937a and IN937b) with no fungicide and bactericide application regulated by investigators. Nonbacterized control in each location was separated from PGPR treatment, preventing contamination of pesticides from nonbacterized field to PGPR field. The plot (1m wide) represented as replication of treatment; however, the length of plot in each location was different due to having unequal investigating area. Each plot was separated 1 m and each plant within the plot

was spaced at 50 cm. Weeds were periodically eradicated either mechanically or by hand.

Seeds of cucumber and long cayenne pepper were soaked in 100 ml bacterial suspensions (10^{11} cells/ml in total of IN937a+IN937b mixtures), using the same procedure mentioned above, and were planted in a plastic seedling tray containing sterile soilless peat-based medium. Seeds in nonbacterized control were soaked in TSB. All seedling plants were maintained in the greenhouse. Ten ml of bacterial suspension (10^8 cells/ml in total of IN937a+IN937b mixtures) was drenched to each cucumber and long cayenne pepper plant in a plastic tray 5 days and 1 month after seeding, respectively. Nonbacterized control plant was drenched with 10 ml of diluted TSB in sterile distilled water. Plants were transferred to the grower's field 7 days after soil drench.

In PGPR treatment, liquid fertilizers (both 16-20-0 and 7-13-21) were applied to cucumber and long cayenne pepper plants as the time required which was similar to the first year study. Insecticide (methamidophos) and/or *Bacillus thuringiensis* were applied only at the plant's vegetative growth. Growers in each location applied pesticides with their own traditional ways. Each grower applied different types of chemical fertilizers to their responsible fields. At least one fertilizer application (suitable for plant growth) was applied during plant's vegetative growth stage and at least two fertilizer applications (suitable for plant production) were applied during plant's production stage. The practice was recorded and reported to the investigators every week.

2.4.1. Pepper mosaic, bacterial wilt, and southern blight diseases

Naturally-occurring mosaic symptom, bacterial wilt symptom caused by *R. solanacearum*, and southern blight symptom caused by *Sclerotium rolfsii* on pepper

plants were observed every week after transplanting and were recorded as disease incidence throughout the season. Disease incidence was recorded on each plant. No appearance of disease symptom was rated as healthy plant. Normally, each symptom appeared notably on each infected plant leading to easier for differentiation of what type of disease incidence.

2.4.2. Cucumber downy mildew disease

Naturally-occurring downy mildew symptom caused by *Pseudoperonospora cubensis* on cucumber plants was observed every week after transplanting and was recorded as disease severity throughout the season. In winter (November 2004 to February 2005); the plot was rated once by walking through each plot. Disease severity was rated on a six-level scale: 0=no symptom, 1=10% of the whole plot showing symptom, 2=25% of the whole plot showing symptom, 3=50% of the whole plot showing symptom, 4=75% of the whole plot showing symptom, 5= 100% of the whole plot showing symptom. In rainy season (June to September 2005), disease severity was rated systematically, at least 5 times along each plot depending on the length of the plot.

Marketable cucumber and pepper fruits were harvested until the end of the season; however, the fruit weight from both treatments could not be performed for statistical comparison due to harvesting practice in collective manner of the growers.

2.4.3. Identification of the casual agent of naturally-occurring pepper mosaic disease

Infected young long cayenne pepper leaves were collected and sent to Plant Genetic Engineering Unit, Kasetsart University, Nakorn Pathom, Thailand for identification of the possible causal agent by using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

2.4.4 Statistical analyses

Disease incidence and severity were analyzed using an Independent Samples *t*-test at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$. All statistical analyses were performed on SAS software (SAS Institute, Gary, NC, USA).

3. Results

3.1. Chemical and physical soil properties

Soil textures from four locations (fields A, B, C and D) were silt loam, while from field E was silt. Organic matters (OM) of all locations were ranging from 4.11 to 1.06. The percentage of total nitrogen (TN) in fields A (TN=0.16) and B (TN=0.13) were 10 times greater than those in fields C (TN=0.01), D (TN=0.01), and E (TN=0.01). Field E had the highest amount of available phosphorus (A_{Pho}=13.01 ppm) which was 10 times, 3 times and 2 times greater than in field D, field B, and fields A&C, respectively. Available potassium (A_{Pot}) was varied among all locations ranging from 44.52-21.21 ppm. Soil pH was varied from moderately acid (field B=5.68), slightly acid (field C= 6.57; field D=6.32), neutral (field A=6.95) to slightly alkaline (field E=7.5).

3.2. First year study

3.2.1 Cucumber mosaic disease

In winter of 2003, mosaic symptom first appeared on some younger leaves 2 weeks after flower set. Susceptible plants slowly developed systemic disease throughout the whole plant. In field A, cucumbers in PGPR treatments induced by mixtures of IN937a+IN937b and a single IN937a strain showed significant reduction in mosaic disease incidence ($P \leq 0.05$), approximately 21% and 17%, respectively, compared to

nonbacterized control. Both PGPR treatments gave similar protection against mosaic symptom. Unfortunately, cucumber plants of all treatments in field B were infected. Mosaic symptom in the rainy season of 2004 occurred on younger leaves one month after transplanting. This was later than the previous season. PGPR mixtures gave significant reduction of disease incidence ($P \leq 0.05$) at least 30% in both locations compared to nonbacterized control. Cucumbers treated with individual IN937a generally provided lower disease incidence than those in nonbacterized control, but significance was observed only in field B (Table 1).

In general, cucumbers in PGPR treatments had superior plant height and total fruit weight than cucumbers in nonbacterized control. In winter of 2003, PGPR mixtures provided significant difference ($P \leq 0.05$) of plant height only in field B and of total fruit weight only in field A compared to nonbacterized control. In rainy season of 2004, mixtures of IN937a+IN937b significantly ($P \leq 0.05$) enhanced cucumber height and yield increase in both locations compared with nonbacterized control, while IN937a alone significantly enhanced yield increase only in field A. Even though, PGPR mixtures provided greater plant height and yield of cucumbers than a single IN937a strain, significant difference of total fruit weight was occurred only in field A in rainy of 2004 (Table 1).

Some aphids were spatially apparent underneath cucumber leaves in field A throughout the season during winter of 2003. Cucumbers in field B, on the other hand, were heavily infested by aphids during the late season. The appearance of aphids in rainy season of 2004 was present later than in the previous season. During vegetative growth, some cucumber leaves were damaged by diamondback moths.

3.2.2. Tomato yellow leaf curl disease

In winter of 2003, yellow leaf curl symptom first appeared on lower leaves of some tomato plants before flower set. However, in the rainy season of 2004, the disease occurred on tomato leaves three weeks after transplanting, which was earlier than in winter. Some susceptible control plants quickly developed systemic symptom throughout the plant, causing severe stunting without any fruit production. Moreover, severe infected leaves also had necrosis at the leaf edges. In both locations, PGPR mixtures had significantly disease severity reduction ($P \leq 0.05$) ranging from 22-30% compared to nonbacterized control. A single strain of IN937a provided significant reduction of disease severity only in field B during winter of 2003. In rainy of 2004, PGPR mixtures gave better significant protection against yellow leaf curl disease than in a single IN937a strain in both locations. Cucumbers in a single IN937a treatment had similar disease severity as occurred in nonbacterized control (Table 2).

PGPR mixtures consistently enhanced both growth promotion and fruit yield of tomato plants. The difference, compared with nonbacterized control, was significant ($P \leq 0.05$) across locations and seasons. However, IN937a alone only provided significantly higher growth and greater yield on particular location and season. Tomato in PGPR mixtures generally had greater plant height and yield than tomato in IN937a alone, but significant enhancement of plant height only occurred in field B in both seasons (Table 2). Whiteflies were spatially appeared underneath tomato leaves in both seasons.

3.2.3. *Pepper mosaic disease*

In winter of 2003, some mosaic symptom first occurred on younger pepper leaves in PGPR and nonbacterized control three weeks after transplanting. Systemic disease symptom quickly developed in susceptible nonbacterized control plants. Pepper

plants induced by PGPR mixtures showed significant lower mean mosaic incidence ($P \leq 0.05$) than those in IN937a alone and nonbacterized control in both locations, while a single strain of IN937a had significant reduction of disease incidence only in field A compared to nonbacterized control. Mean pepper height of all treatments were similar. Both PGPR treatments significantly enhanced total fruit yield ($P \leq 0.05$) only in field A compared to nonbacterized control. In general, pepper growth and yield in field B of all treatments were less than those in field A (Table 3). Some whiteflies and aphids appeared underneath pepper leaves.

In rainy season of 2004, there was an outbreak of thrips on pepper plants two weeks after transplanting. The occurrence triggered severe curly top in both locations. Most pepper plants were stunted and had no produces, resulting in no data available from this season.

3.2.4 Causal agents of infected plants

Results from PCR and reverse transcriptase-PCR reaction techniques showed that mosaic disease on cucumber was caused by *Cucumber mosaic virus* (CMV). Yellow leaf curl disease on tomato and mosaic disease on long cayenne pepper were caused by *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).

3.3. Second year study

3.3.1 Chemical application in nonbacterized control

Each volunteer utilized different kinds of pesticides for their responsible fields. The application time and frequency use were varied among those volunteers in each season.

3.3.1.1 Long cayenne pepper plot

In winter of 2004, most volunteers first applied insecticide during plant's vegetative growth stage and continued their applications until the flower set. Volunteer in field C applied cypermethrin at 6 and 7 weeks after transplanting (WAT). Volunteer in field D applied chlorpyrifos at 4, 5, and 6 WAT. Volunteer in field E applied dicofol at 3, 4, 6, and 7 WAT. In rainy of 2005, both volunteers in fields C and E applied insecticide from the vegetative growth until the fruit set. Volunteer in field C applied cypermethrin at 4 and 9 WAT. Volunteer in field E applied 2 different insecticides utilizing dicofol at 2 and 4 WAT, and applied dimethoate at 5, 6, 7, 10, and 11 WAT.

For fungicide application, mancozep was applied in field D at 4 and 6 WAT in winter of 2004. No fungicide was applied in field C and E in both seasons.

Auxins-type hormone was applied in nonbacterized control of all locations. Volunteer in field C applied hormone at 3, 5, and 6 WAT in winter of 2004, while applied at 4, 5, and 7 WAT in rainy of 2005. Volunteer in field D applied hormone only one time at 5 WAT in winter of 2004. Volunteer in field E applied hormone one time at 6 WAT in winter of 2004, while applied at 7, 10, and 11 WAT in rainy of 20

3.3.1.2 Cucumber plots

Volunteer in field C applied cypermethrin 3 times in both seasons. It was applied during 3-6 WAT in winter of 2004, while was applied during 2-7 WAT in rainy of 2005. Volunteer in field D applied chlorpyrifos at 4, 5, and 6 WAT in winter of 2004. Volunteer in field E applied dicofol at 3 and 4 WAT in winter of 2004, while applied dicofol at 2 and 3 WAT and then applied one more time with dicotophos at 5 WAT in rainy of 2005.

For fungicide use to control downy mildew disease, volunteer in field C applied metalaxyl one time at 4 WAT in winter of 2004, while applied mancozeb two times during 5-6 WAT in rainy of 2005. Volunteer in field D applied mancozeb two times during 4-6 WAT in winter of 2004. Volunteer in field E applied 10% copper sulfate one time at 6 WAT in winter of 2004, while applied two times during 5-7 WAT in rainy of 2005.

Volunteer in field C applied hormone 3 times during 3-5 WAT, while applied two times during 2-3 WAT in rainy of 2005. Volunteer in field D applied hormone one time at 5 WAT. No hormone was applied in field E in winter of 2004, but it was applied one time at transplanting day and two more times during 2-3 WAT in rainy of 2005.

3.3.2 Long cayenne pepper diseases

In winter of 2004, two diseases occurred on long cayenne pepper plants in field C of both treatments. One was mosaic disease caused by TYLCV (according to PCR result) and another was bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanaceum*.

However, the major disease in this field was mosaic symptom. Mosaic symptom first appeared on some younger pepper leaves five weeks after transplanting, and susceptible plants later showed systemic disease. Some long cayenne peppers which were infected by bacterial wilt first appeared a sudden wilt during flower set. Then, susceptible plants showed systemic wilt and died during the fruit set. The stem vascular tissues of infected bacterial wilt turned brown. Bacterial streaming, a whitish bacterial exudates, was coming out from the cut infected long cayenne pepper stem when immersed in clear water. The percentage of both disease incidences was higher overtime. Long cayenne pepper induced by PGPR mixtures had significant lower mean percentage of mosaic disease incidence approximately 40% than those in nonbacterized control at 11 weeks

after transplanting (WAT). However, mean percentage of bacterial wilt disease incidence was similar in both treatments. The total fruit yield of peppers in PGPR mixtures was approximately 26% greater than those in nonbacterized control (Table 4).

Only bacterial wilt disease caused by *R. solanacearum* was a major disease on long cayenne pepper in field D. Initial bacterial wilt symptom appeared on some pepper leaves during the fruit set. Then, several susceptible plants in nonbacterized control quickly developed systemic wilt in a short period of time and died during harvesting time. Almost 100 percent of wilt disease incidence occurred in nonbacterized control during the late season. Long cayenne peppers in PGPR mixtures slowly developed the disease during mid-season, but the incidence quickly increased in the late season. At 11 WAT, mean percentage of bacterial wilt incidence in PGPR mixtures was significantly lower approximately 31% than those in nonbacterized control. The total fruit yield of peppers in PGPR mixtures was approximately 70% greater than those in nonbacterized control (Table 4).

The major disease in field E was mosaic symptom which first appeared on long cayenne peppers leaves one month after transplanting. According to PCR result, infected mosaic symptom was caused by TYLCV. A minor fungal disease, southern blight caused by *Sclerotium rolfsii*, later occurred on some pepper plants in both treatments. The fungal sclerotia and white mass of mycelia were observed around infected stem base after the plant showing obvious wilt symptom. In general, peppers induced by PGPR mixtures had significant reductions of both disease incidences throughout the season compared to nonbacterized control. At 11 WAT, PGPR mixtures provided approximately 55% lesser mean percentage of mosaic incidence than in nonbacterized control. Peppers in PGPR mixtures also had 58% lesser mean percentage of southern blight incidence than peppers in nonbacterized control. Additionally, total

pepper fruit yield in PGPR mixtures was at least 20% greater than nonbacterized control (Table 4). Approximately 20 pepper plants in PGPR treatments were totally damaged by thrips during the mid season, causing barely fruit production. To avoid of thrips outbreak in PGPR field, all damaged plants were taken out and destroyed.

In rainy season of 2005, the same diseases first appeared at similar time after transplanting. Mosaic disease slowly developed on peppers in field C throughout the season. Mean percentage of bacterial wilt incidence in nonbacterized control was greater than in the previous season. In this season, pepper plant growth was slowly developed. Plant height was smaller than those in the winter season. PGPR mixtures provided significant reduction of both mean percentage of mosaic incidence ($P \leq 0.05$) and bacterial wilt incidence ($P \leq 0.01$) throughout the season compared to nonbacterized control. It also gave 30% greater total fruit yield than nonbacterized control (Table 5). In contrast, mosaic disease quickly developed on peppers of both treatments in field E. Southern blight disease incidence, however, slowly developed in this season. Mean percentage of both disease incidences in PGPR mixtures were significant lower ($P \leq 0.05$) than those in nonbacterized control (Table 5). Total fruit yield in PGPR mixtures was 11% greater than that in nonbacterized control. Some aphids and whiteflies occurred spatially in the field.

3.3.3 *Cucumber disease*

In winter of 2004, the major disease occurring in all locations was downy mildew disease caused by the fungus *Pseudoperonospora cubensis*. Three weeks after transplanting, some small, pale yellow, irregular spots appeared on the upper surface of the leaves. A typical sign of this disease can be observed in the early morning, especially a downy growth of the sporophores of the fungus appeared on the underside

of the spots. Downy mildew disease quickly spread from the lower to the upper plant's part of susceptible plants. At 5 WAT, mean downy mildew severity in all locations of PGPR mixtures was significantly lower than those in nonbacterized control. Only cucumbers induced by PGPR mixtures in fields C and D continued to have significant protection through 7 WAT. Generally, cucumbers in PGPR mixtures had greater total fruit yield than those in nonbacterized control, except cucumbers in field D which was a little bit lower than nonbacterized control (Table 6). In rainy season of 2005, cucumbers in PGPR mixtures in both fields C and E provided the same disease protection as occurred in winter of 2004. In general, total cucumber fruit yield in PGPR mixtures was greater than those in nonbacterized control (Table 7).

4. Discussion

Previous investigations reported that combinations of biological control agents (BCAs) have reduced variability of disease protection (Guetsky et al. 2001; Guetsky et al., 2002). Combining BCAs strains resulted in a higher level of protection (Dunne et al. 1998; Raupach, and Kloepper, 1998; Nandakumar et al., 2001; de Boer et al., 2003) and also enhanced plant growth promotion (Raupach, and Kloepper, 1998; Nandakumar et al., 2001; Siddiqui and Shaukat, 2002;). However, some investigations demonstrated that combinations of biological control agents (BCAs) resulted in decreased biocontrol efficacy relative to individual applications due to incompatibility of BCA organisms (Leeman et al, 1996; Leibinger et al., 1997; Meyer and Roberts, 2002; Roberts et al., 2005).

Our first year results showed that PGPR mixtures (strain IN937a+IN937b) most provided mean disease severity or disease incidence lower than those in a single IN937a strain. Plant induced by mixtures of PGPR strains IN937a+IN937b, in particular

seasons, gave significantly lesser tomato yellow leaf curl severity and long cayenne pepper mosaic incidence than IN937a alone. PGPR mixtures also gave lower cucumber mosaic incidence in particular field than in a single IN937a strain. Results from this study showed that diminished disease suppression did not occur in PGPR mixtures but rather increased in the opposite direction relative to a single PGPR strain application. This indicates that combining certain compatible microorganisms generally provide increase disease protection with more consistent performance than those applied alone. Moreover, an application of compatible PGPR mixtures would be more closely related to natural situation which might broaden the spectrum of biological control activity with reliability of control. Also, the specific adaptation of individual microorganism at particular environment may result in diverse performance.

Eventhough one experiment of long cayenne pepper in fields A and B in rainy of 2004 was totally damaged by insect and no data were available, significant disease suppression of mosaic symptom caused by TYLCV in PGPR mixtures also occurred on peppers in fields C and E in both seasons of the second year study. PGPR mixtures also significantly suppressed a minor southern blight disease in field E of both seasons. Moreover, strains of IN937a+IN937b also significantly suppressed a major bacterial wilt disease in field D in winter of 2004 and a minor bacterial wilt in field C in rainy of 2005. Our previous *in vitro* antibiosis study showed that PGPR strains IN937a and IN937b were not antibiotic against *Ralstonia solanacearum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Rhizoctonia solani* (Jetiyanon and Kloepper, 2002). With our *in vitro* antibiosis study of those two PGPR strains against *Sclerotium rolfsii* also showed no antibiotic activity (data not shown), suggesting but not proving that the control mechanism of naturally-occurring soil-borne pathogens in this study is not a direct antagonism. These results could be interpreted that strains of IN937a+IN937b had

ability of broad-spectrum activity for induced disease resistance against TYLCV, *S. rolfsii* and *R. solanacearum* on long cayenne peppers at various environments with consistent effectiveness.

In the second year study, each grower differently applied fungicide to control downy mildew disease in cucumbers during symptomatic appearance. However, plants induced by PGPR mixtures (strain IN937a+strain IN937b) generally had lower disease severity in both seasons in all locations and at least two locations (fields C and D) significantly suppressed downy mildew throughout the season when compared to nonbacterized control. These results showed that PGPR mixtures had similar or better performance on controlling downy mildew disease compared to fungicide used in nonbacterized control.

Results from two consecutive years revealed that mixtures of compatible PGPR strains (IN937a+IN937b) expressed most consistent disease protection throughout the seasons against broad spectrum of naturally infested by indigenous *Cucumber mosaic virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Ralstonia. solanacearum*, *Sclerotium rolfsii*, and *Pseudoperonospora cubensis* at different grower's locations, having various soil parameters. This may be concluded that compatible PGPR mixtures had a potential application for broaden disease suppression against multiple diseases at different variability in environments with consistent performance. Moreover, our findings presented here was also the beginning of transferred technology to genuinely agricultural community. Therefore, suitable formulation and delivery system of PGPR product which is similar to chemical application should be further investigated whether grower would adopt this PGPR approach to be one of their practices or not. Finally, to answer basic scientific question, we are investigating whether similar defense responses

of plants induced by PGPR mixtures (strain IN937a+IN937b) are sharing among different pathosystems.

Acknowledgements

We would like to express our appreciation to Thailand Research Fund (grant no. RSA4680006) and Naresuan University for supporting this research project. Our sincere gratitude went to Prof. Joseph W. Kloepper who kindly provided us with PGPR strains for investigation.

References

- de Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J. J. B., van der Sluis, I., van Loon, L. C., and Bakker, P. A. H. M. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93, 626-632.
- Dunne, C., Moenne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., and O’Gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium* mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathol.* 47, 299-307.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91, 621-627.

- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., and Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92, 976-985.
- Jetiyanon, K., Kloepper, J. W., 2002. Mixtures of plant growthpromoting rhizobacteria for induction of resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24, 285-291.
- Jetiyanon, K., Fowler, W. D., Kloepper, J. W., 2003. Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field condtions in Thailand. *Plant Dis.* 87, 1390-1394.
- Kloepper, J.W., Reddy, M.S., Kenney, D.S., Vavrina, C., Kokalis-Burelle, N., and Martinez-Ochoa, N., 2004. Theory and applications of rhizobacteria for transplant production and yield enhancement. *Proc. XXVI IHC-Transplant Production and Stand Establishment*. S. Nicola, J. Nowak, and C.S. Vavrina, eds. *Acta Hortic.* 631, 217-229.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2003. Amendment of muskmelon transplant media with plant growth-promoting rhizobacteria: effects on seedling quality, disease, and nematode resistance. *Hortechonology* 13, 476-482.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C. S., Rosskopf, E. N., Shelby, R. A., 2002. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production. *Plant Soil* 238, 257-266.

Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K., 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87, 1103-1110.

Leeman, M., Den Ouden, G.M., Van Pelt, J.A., Matamala-Garros, A., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B., 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. And root-colonizing fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 21-31.

Meyer, S.L.F., Roberts, D.P., 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *J. Nematol.* 34,1-8.

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T., Samiyappan, R., 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *BioControl* 46, 493-510.

Raupach, G. S., Kloepper, J. W., 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88, 1558-1164.

Raupach, G. S., Kloepper, J. W., 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84, 1073-1075.

Roberts, D.P., Lohrke, S.M., Meyer, S.L.F., Buyer, J.S., Bowers, J.H., Baker, C.J., Li, W., de Souza, J.T., Lewis, J.A., Chung, S., 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* 24, 141-155.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2002. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. *Biol. Fert. Soils*. 36, 260-268.

Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J., and Kloepper, J. W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 39-50

Table 1. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on cucumber runner length, fruit fresh weight, and disease resistance against *Cucumber mosaic virus* in fields A and field B^u.

Treatment ^v	Mean plant height ^w (cm)				Mean total fruit weight ^x (kg./plot)				Mean mosaic incidence ^y (plant/plot)			
	Winter 2003		Rainy 2004		Winter 2003		Rainy 2004		Winter 2003		Rainy 2004	
	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B
Nonbacterized control	128.6a	83.2b ^z	162.9b	141.8b	7.2b	2.8a	13.5c	13.1b	14.2a	18	12.6a	11.6a
IN937a alone	135.7a	93.3ab	167.9ab	152.3ab	8.9ab	3.8a	14.8b	13.9ab	11.8b	18	9.4ab	8.4b
IN937a+IN937b	140.1a	98.6a	179.4a	158.0a	9.7a	4.3a	17.5a	16.7a	11.2b	18	8.4b	8.0b
LSD _{0.05}	12.7	13.3	13.7	10.9	1.8	1.4	0.8	3.0	1.7	-	3.2	1.7

^u Field experiments were conducted in winter season (November 2003-February 2004) and rainy season (June-September 2004). The experimental design was a randomized complete block with three treatments, each with five replications. Each plot (1m wideX10 m long) represents as a replication. Fields A and B located in Bungphra District.

^v PGPR strain identifications: Strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens*; Strain IN937b = *Bacillus pumilus*

^w Mean length of main runner was measured 1 month after transplanting.

^x Mean total fruit weight from 18 plants per plot from cumulative harvests until the end of the season.

^y Mean mosaic incidence on cucumber plants was obtained 35 days after transplanting.

^z Numbers with different letters show significant difference at $P \leq 0.05$ according to least significant difference (LSD) test.

Table 2 Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato height, fruit fresh weight, and disease resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* in fields A and field B^u.

Treatment ^v	Mean plant height ^w (cm)				Mean total fruit weight ^x (kg./plot)				Mean yellow leaf curl severity ^y (%)			
	Winter 2003		Rainy 2004		Winter 2003		Rainy 2004		Winter 2003		Rainy 2004	
	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B
Nonbacterized control	96.1b ^z	62.7b	97.5b	86.9c	7.3b	2.7b	6.3b	7.8b	46.4a	60.6a	63.3a	60.4a
IN937a alone	106.1a	67.4b	107.8a	97.1b	8.8a	3.6ab	8.8a	9.2ab	35.9ab	43.2b	66.0a	53.9a
IN937a+IN937b	109.2a	74.5a	113.9a	104.6a	9.1a	4.0a	9.5a	10.1a	33.8b	38.5b	49.0b	42.3b
LSD _{0.05}	9.7	6.7	8.3	6.9	0.8	1.2	1.4	1.5	12.2	13.5	13.5	10.0

^u Field experiments were conducted in winter season (November 2003-February 2004) and rainy season (June-September 2004). The experimental design was a randomized complete block with three treatments, each with five replications. Each plot (1m wideX10 m long) represents as a replication. Fields A and B located in Bungphra District.

^v PGPR strain identifications: Strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens*; Strain IN937b = *Bacillus pumilus*

^w Mean plant height was measured 1 month after transplanting.

^x Mean total fruit weight from 18 plants per plot from cumulative harvests until the end of the season.

^y Mean percentage of yellow leaf curl severity on tomato plants was obtained 60 days after transplanting.

^z Numbers with different letters show significant difference at $P \leq 0.05$ according to least significant difference (LSD) test.

Table 3 Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on long cayenne pepper height, fruit fresh weight, and disease resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* in fields A and B^u.

Treatment ^v	Mean plant height ^w (cm)		Mean total fruit weight ^x (kg./plot)		Mean mosaic incidence ^y (plant/plot)	
	Field A	Field B	Field A	Field B	Field A	Field B
Nonbacterized control	72.7 a	52.3 a	7.7 b ^z	2.6 a	15.2 a	15.4 a
IN937a alone	74.5 a	53.9 a	9.3 a	2.8 a	12.8 b	15.2 a
IN937a+IN937b	76.1 a	56.7 a	9.4 a	2.9 a	9.8 c	11.6 b
LSD _{0.05}	6.3	7.5	1.5	0.6	2.3	3.1

^u Field experiments were conducted in winter season (November 2003-February 2004). The experimental design was a randomized complete block with three treatments, each with five replications. Each plot (1m wideX10 m long) represents as a replication. Fields A and B located in Bungphra District.

^v PGPR strain identifications: Strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens*; Strain IN937b = *Bacillus pumilus*

^w Mean plant height was measured 1 month after transplanting.

^x Mean total fruit weight from 18 plants per plot from cumulative harvests until the end of the season.

^y Mean mosaic incidence on long cayenne pepper plants was obtained 60 days after transplanting.

^zNumbers with different letters show significant difference at $P \leq 0.05$ according to least significant difference (LSD) test.

Table 4 Effects of PGPR mixtures on long cayenne pepper for yield increase and for induced systemic resistance against *Tomato yellow leaf curl virus*, *Ralstonia solanacearum*, and *Sclerotium rolfsii* 11 weeks after transplanting to field C, field D, and field E during winter season (November 2004-February 2005).

Treatment ^a	Mean percentage of disease incidence					Total fruit ^x yield at field C (Kg)	Total fruit yield at field D (Kg)	Total fruit yield at field E (Kg)
	Field C ^r		Field D ^s		Field E ^t			
	Mosaic ^u	Bacterial wilt ^v	Bacterial wilt	Mosaic	Southern blight ^w			
Nonbacterized Control	78.63±2.12 ^y	2.72±0.40	96.90±1.96	77.35±5.48	13.05±2.09	378.7	26.0	234.7
PGPR mixtures	46.88±4.10 ^{**}	2.03±0.29	66.86±9.33 [*]	42.84±4.31 ^{**}	5.40±1.77 [*]	510.5	89.0	299.1

^aThe experimental design was randomized of treatments. PGPR mixtures were strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens* and strain IN937b = *Bacillus pumilus*. Fields C and D located in Watprig District, while field E located in Tapho District.

^tNonbacterized control had 11 plots (1m wide and 20m long), containing 40 plants each. PGPR mixtures had 7 plots (1m wide and 32m long), containing 63 plants each.

^sNonbacterized control and PGPR mixtures had 5 plots (1m wide and 29m long), containing 58 plants each.

^rNonbacterized control had 4 plots (1m wide and 45m long), containing 90 plants each. PGPR mixtures had 5 plots (1m wide and 36m long), containing 72 each.

^uMosaic disease is caused by *Tomato yellow leaf curl virus*

^vBacterial wilt disease is caused by *Ralstonia solanacearum*

^wSouthern blight disease is caused by *Sclerotium rolfsii*.

^xTotal yield was obtained from the beginning of harvesting until the end of the season. No statistics was shown due to harvesting practice in collective manner of the growers.

^yFigures indicated after ± represent SEM.

^{*}Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.05$ according to Independent Samples *t*-Test.

^{**}Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.01$ according to Independent Samples *t*-Test.

Table 5 Effects of PGPR mixtures on long cayenne pepper for yield increase and for induced systemic resistance against *Tomato yellow leaf curl virus*, *Ralstonia solanacearum*, and *Sclerotium rolfsii* 11 weeks after transplanting in field C and field E during rainy season (June-September 2005).

Treatment ^a	Mean percentage of disease incidence				Total fruit ^w yield at field C (Kg)	Total fruit yield at field E (Kg)
	Field C ^r		Field E ^s			
	Mosaic ^t	Bacterial wilt ^u	Mosaic	Southern blight ^v		
Nonbacterized Control	34.68±1.59 ^x	9.06±1.41	90.70±2.76	7.14±0.58	80.5	172.1
PGPR mixtures	29.37±1.75 [*]	2.50±1.25 ^{**}	80.75±2.49 [*]	3.90±0.67 [*]	115.2	194.0

^aThe experimental design was randomized of treatments. PGPR mixtures were strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens* and strain IN937b = *Bacillus pumilus*. Field C located in Watprig District, while field E located in Tapho District.

^r Nonbacterized control and PGPR mixtures had 8 plots (1m wide and 20m long), containing 40 plants each.

^s Nonbacterized control and PGPR mixtures had 4 plots (1m wide and 35m long), containing 70 plants each.

^t Mosaic disease is caused by *Tomato yellow leaf curl virus*

^u Bacterial wilt disease is caused by *Ralstonia solanacearum*

^v Southern blight disease is caused by *Sclerotium rolfsii*.

^w Total yield was obtained from the beginning of harvesting until the end of the season. No statistics was shown due to harvesting practice in collective manner of the growers.

^x Figures indicated after ± represent SEM.

^{*} Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.05$ according to Independent Samples *t*-Test.

^{**} Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.01$ according to Independent Samples *t*-Test.

Table 6 Effects of PGPR mixtures on cucumber for yield increase and for induced systemic resistance against *Pseudoperonospora cubensis* 5 weeks and 7 weeks after transplanting in field C, field D, and field E during winter season (November 2004-February 2005).

Treatment ^a	Field C ^b			Field D ^c			Field E ^d		
	Mean downy mildew severity ^e		Total fruit yield (Kg) ^f	Mean downy mildew severity		Total fruit yield (Kg)	Mean downy mildew severity		Total fruit yield (Kg)
	5 WAT ^h	7 WAT		5 WAT	7 WAT		5 WAT	7 WAT	
Nonbacterized Control	20.0±2.13 ^g	60.42±3.71	913.5	35.00±6.12	75.00±0.00	249.9	43.75±6.25	50.00±10.21	243.0
PGPR mixtures	10.0±0.00**	37.50±4.72**	1,013.8	19.00±3.67*	55.00±5.00**	231.3	13.00±3.00**	35.00±6.12	265.0

^aThe experimental design was randomized of treatments. PGPR mixtures were strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens* and strain IN937b = *Bacillus pumilus*. Fields C and D located in Watprig District, while field E located in Tapaho District.

^bNonbacterized control had 12 plots (1m wide and 20m long), containing 40 plants each. PGPR mixtures had 8 plots (1m wide and 30m long), containing 60 plants each.

^cNonbacterized control and PGPR mixtures had 5 plots (1m wide and 29m long), containing 58 plants each.

^dNonbacterized control had 4 plots (1m wide and 45m long), containing 90 plants each. PGPR mixtures had 5 plots (1m wide and 36m long), containing 72 plants each.

^eDisease severity was rated 6 scales as the following: 0%=no disease; 10%=disease appearing 10% of the whole plot; 25%=disease appearing 25% of the whole plot; 50%=disease appearing 50% of the whole plot; 75%=disease appearing 75% of the whole plot; 100%=disease appearing entire plot. The plot was rated once by walking through each plot.

^fTotal yield was obtained from the beginning of harvesting until the end of the season. No statistics was shown due to harvesting practice in collective manner of the growers.

^gFigures indicated after ± represent SEM.

^hWAT is week after transplanting to grower's field.

*Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.05$ according to Independent Samples *t*-Test.

**Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.01$ according to Independent Samples *t*-Test.

Table 7 Effects of PGPR mixtures for yield increase and for induced systemic resistance against *Pseudoperonospora cubensis* 5 weeks and 7 weeks after transplanting in field C and field E during rainy season (June-September 2005).

Treatment ^a	Field C ^b		Field E ^c		
	Mean downy mildew severity ^d		Total fruit yield (Kg) ^e	Mean downy mildew severity	
	5 WAT ^f	7 WAT		5 WAT	7 WAT
Nonbacterized Control	55.00±1.83 ^g	80.63±1.67	492.1	34.53±2.56	67.0±2.08
PGPR mixtures	32.50±1.83 ^{**}	70.00±1.83 ^{**}	611.2	17.50±2.52 ^{**}	62.5±2.25
					458.6

^aThe experimental design was randomized of treatments. PGPR mixtures were strain IN937a = *Bacillus amyloliquefaciens* and strain IN937b = *Bacillus pumilus*. Field C located in Watprig District, while field E located in Tapho District.

^bNonbacterized control and PGPR mixtures had 8 plots (1m wide and 20m long), containing 40 plants each.

^cNonbacterized control and PGPR mixtures had 4 plots (1m wide and 35m long), containing 70 plants each.

^dDisease severity in field C was rated 5 times along each plot. Disease severity in field E was rated 8 times along each plot.

^eTotal yield was obtained from the beginning of harvesting until the end of the season. No statistics was shown due to harvesting practice in collective manner of the growers.

^fWAT is week after transplanting to grower's field.

^gFigures indicated after ± represent SEM.

^{**}Indicate significant treatment effects compared to nonbacterized control at $P \leq 0.01$ according to Independent Samples *t*-Test.

1 **The Effect of Intervention on Knowledge and Awareness of Pest Management and Biological**
2 **Control Measures among Thai Farmers**

3 **Kanchalee Jetiyanon^{a*} Pinyupa Plianbangchang^b and Piyarat Nimpitakpong^b**

4

5 ^a Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environmental Sciences, Naresuan University,
6 Phitsanulok, 65000 Thailand.

7 ^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000 Thailand

8 * Corresponding author: K. Jetiyanon Tel. 66-55-261000-4 ext. 2722 Fax. 66-55-261040

9 E-mail address: kanchaleej@nu.ac.th (K. Jetiyanon).

The Effect of Intervention on Knowledge and Awareness of Pest Management and Biological Control Measures among Thai Farmers

Abstract

Pesticide use for pest management has become a serious problem in Thailand. Attempts to promote the adoption of environmental-friendly measures have been so far disappointing. This failure is likely to be due to the incompatibilities of innovation with the adopters. Therefore, an effective intervention is highly essential to switch farmers from conventional to alternative practices. In this study, Diffusion of Innovations Theory was used as a theoretical framework to (1) investigate the effect of intervention on farmers' knowledge and awareness; and (2) examine the relationship between prior conditions and the change of knowledge and awareness of pest management and biological control measures. This one-group, pre-post, quasi-experimental study consisted of a one-day lecture/discussion and a field demonstration, with one-, three-, and six-month follow-ups. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) was used as a case study of plant disease biological control measure. We found that the intervention significantly affected farmers' knowledge. In addition, the gain of knowledge was consistent in farmers of different age, gender, educational level, and frequency of pesticide use. However, the activities did not exhibit a significant effect on farmers' awareness, except a minor improvement in the awareness of pesticide harm. Changes of knowledge and awareness persisted to at least six months. We conclude that our intervention had a significantly positive impact on farmers' knowledge of pest management and biological control measures. In addition, farmers of different prior conditions were able to gain knowledge from our intervention, which indicated that our intervention was suitable for farmers of various backgrounds.

Keywords Diffusion of Innovations, intervention, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, knowledge, awareness, Thailand, farmers

Introduction

The use of chemical pesticides for plant disease control is inevitable in Thailand since its climate is suitable for plant disease development. In addition, most Thai farmers believe that pesticides are the only option for maintaining the quality and quantity of their produces. Most of the pesticides used in the country are imported. During 1999-2004, the total quantity of imported pesticides increased from 51,344 to 99,829 tons, causing the escalated values from 6,417.46 to 10,370.69 million Baht (Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2005). The Ministry of Public Health (2004) reported that such continuously misuse and overuse of pesticides cause dramatic impacts on human health and the environment.

Concerns about the negative impact of modern agricultural practices, scientists all over the world have been constantly trying to seek for more environmental-friendly methods other than chemical pesticides to regulate plant diseases. Biological control measure is one of the promising methods which have been studied for several decades. In recent years, microbial inoculant technology involving plant-beneficial microorganisms such as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) has drawn substantial attention from scientists around the world. PGPR is used for growth promotion or "biofertilizers" (Kloepper et al., 1986; Lambert and Joos, 1989; Kloepper et al., 1989; Glick et al., 1994; Zhang et al., 1996). The technique can also be utilized as plant disease suppression or "biological control agent" (Van Peer, et al., 1991; Hebber, et al., 1992; Wei, et al., 1992; Liu et al., 1995a; 1995b; Raupach, et al., 1996; Kim et al., 1997; Rodriguez and Pfender, 1997; Jetiyanon and Kloepper., 2002; Jetiyanon et al., 2003). This innovation seems to be a promising tool for sustainable plant production.

One of the Thai Government's policies in the Ninth National Economic and Social Development Plan (2002-2006) indicated that the country must achieve sustainable development including human and environmental resources. There are many strategies to accomplish the aforementioned policies such as promoting environmental awareness in rural areas, supporting safe agriculture and natural agriculture, and implementing appropriate innovations based on research studies to change the sector toward sustainability (Office of the Prime Minister, 2001).

However, numbers of initiatives from both governmental and non-governmental entities to promote the adoption and diffusion of more sustainable agricultural technologies among farmers have been so far disappointing. Experiences from a large number of projects indicated that the problem of such failure lie in the incompatibilities of the innovation introduced with the adopters (Laper and Pandey, 1999). Hence, for these interventions to be effective, they should be based on an understanding of what induces the farmers to switch from conventional to alternative practices.

Diffusion of innovations is a complex process involving many factors other than the efficacy of the innovation itself. Previous studies have confirmed that an array of micro- and macro-levels factors, ranging from psychological, sociological, economics to political, also play a significant role in determining the process of innovation adoption of the farmers (Polson and Spencer, 1991; Warriner and Moul, 1992; Fujisaka, 1994; Shiferaw and Holden, 1998; De Souza Filho et al. 1999; Daskalopoulou and Petrou, 2002; Schuck et al., 2002;).

Most of the study on agricultural research and extension to promote changes in the rural areas of different contexts successfully utilized Diffusion of Innovations Theory as their theoretical framework (Black and Reeve, 1993; Morris et al. 2000; Reece and Sumberg, 2003). Diffusion of Innovations Theory considers an innovation as a product, process or way of doing things which is new to the adopters (Roger, 1983). This theory, which may be categorized as one of the information flow and process models (Garforth and Usher 1997), concerns the process of innovation uptake. In addition, the theory delineates psychological and social characteristics of individuals who change more quickly and those who are slow to change, as well as factors affecting the rate of change and the relationship between the nature of an innovation and the dynamics of its adoption. Furthermore, it postulates that prior conditions shape the disposition of potential adopters towards innovations. An innovation-decision process moves the decision makers from initial awareness to eventual adoption or rejection of innovation. This process is influenced by characteristics of the decision makers and the innovation itself, as well as by communication channels and agents of change.

Several studies in the past chose Diffusion of Innovations Theory as a framework for analyzing and understanding the rate of adoption. However, most empirical research investigated the determinants of the rate of adoption by focusing on characteristics of the adopters and, in some cases,

the characteristics of the innovation itself (Fliegel and Kivlin, 1966; Adesinal and Zinnah, 1993; Adesina and Baidu-Forson, 1995; Batz et al., 1999). To the best of our knowledge, there has been no study which examines in details the five-stage adoption process described by Rogers (1983). These stages include (1) knowledge, (2) persuasion, (3) decision, (4) implementation, and (5) confirmation (Figure 1). Each of these stages has particular determinants which Rogers believed would compel the adopters to move from where they are to the next level. Once they are in the decision stage, the adopters may either choose to adopt or reject the innovation. Even if they decided to adopt, they could later on discontinue doing so. Therefore, the process itself is very dynamic.

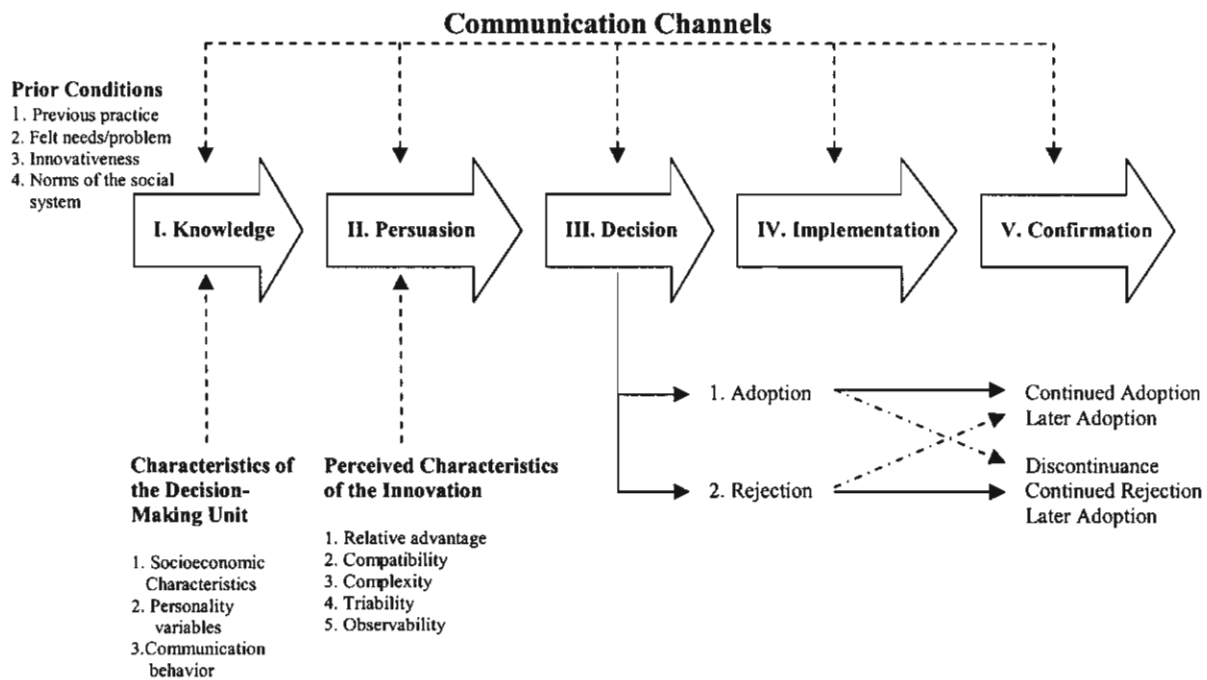


Figure 1 A model of stages in the innovation-decision process (after Rogers, 1983)

Purpose and Objectives

In this paper, we used the model of Stages in the Innovation-Decision Process as a specific framework to discuss the first stage of the process, i.e., knowledge stage. More specifically, the objectives of this study were: (1) to examine the effect of intervention on farmers' knowledge and awareness of pest management and biological control methods; and (2) to examine the relationship between prior conditions (i.e., age, gender, educational level, and frequency of pesticide use) and the change of knowledge and awareness of pest management and biological control measures among farmers.

Methods

This one-group, pre-post, quasi-experimental study was conducted between October 2004 and May 2005, as part of an on-going project which attempts to move vegetable growers from heavy chemical use to the adoption of PGPR technique. The study protocol was approved by Naresuan University Institutional Review Board.

Study Area and Sampling Design

Phitsanulok is located in the lower-northern region of Thailand (Figure 2). The province has the area of 10,815 sq km. The main source of incomes of its people come from agriculture, especially rice and field crops. Even though merely 29.8 sq km of the province is used for vegetable cultivation, its yields are among the most important exporting agricultural products of Thailand, particularly pepper and tomato. The majority of farmer was found to use pesticides aggressively and without proper protection (Kanato, 1998). Huaysungnoen and Yeesoonpan (1999) reported a significantly lower level of acetylcholinesterase among farmers in Phitsanulok, compared with healthy volunteers in the area ($p < 0.005$). This indicated a high level of pesticide accumulation among those farmers which, in turn, would be fatally harmful to their health.



Figure 2 The map of Thailand, illustrating Phitsanulok in the shaded area

The Intervention

Public outreaches to announce the intervention were conducted by the research team one month prior to the scheduling date. All farmers who expressed their interest were invited to join a one-day lecture/discussion and a field demonstration at the Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environmental Sciences, Naresuan University. Transportation was provided for those who had difficulty traveling to the location.

Innovation-Decision Process: The Knowledge Stage

The important concept of knowledge stage is that the way to speed up the decision to adopt is to communicate information about new ideas. The aim of this stage is to gain initial awareness through knowledge and understanding of the purpose and functioning of an innovation. The theory postulates that once an individual is aware of a new idea, the time required for innovation-decision

may be shortened. Studies in the past suggested that mass media, group meeting, and word of mouth were the strategies that could be utilized to increase knowledge and awareness of the adopter. However, Morris and associates (2000) found that only a small number of respondents who had heard about the innovation through word of mouth correctly described its features. Furthermore, the success rate of gaining awareness was affected by characteristics and prior conditions of the adopter such as felt needs, social norm, and policy environment.

Method of Gaining Initial Awareness

Our one-day intervention consisted of two parts: (1) a lecture and group discussion by the researchers/innovators, and (2) a field demonstration. These activities were aimed at increasing knowledge and awareness of the innovation among participating farmers. The lecture/discussion was designed to include three types of knowledge about the innovation: (1) awareness knowledge, (2) how-to knowledge, and (3) principles knowledge. Awareness knowledge is defined as information about the existence of an innovation, or “what is the innovation?” How-to knowledge is the information on how to use such innovation properly, or “how does the innovation work?” Finally, principles knowledge is the information required to understand the functioning principles of the innovation. The lecture/discussion began with the principles knowledge including plant diseases and disease control, as well as general information on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). The lecture/discussion then proceeded to the existence of the innovation (PGPR) and how it worked; the outcomes and advantages of PGPR in terms of plant growth promotion, disease resistance, and environmental friendliness. At the end, the how-to knowledge was introduced and field demonstration was carried out. All aspects of the lecture/discussion were made in lay terminology. During the lecture/discussion and field demonstration, farmers were given opportunities to discuss their ideas with the innovators and their peers.

The Measurements

The effects of the methods on awareness and knowledge gaining were examined using a brief questionnaire which was administered by a group of trained interviewers at pre-intervention,

immediately after the intervention, and at one, three, and six months after the intervention. The instrument was pilot tested to assess its reliability and validity in a sample of farmers in Phitsanulok. The results from pilot study suggested minor modifications to the tool. The revised questionnaire comprised of ten questions on knowledge and ten questions assessing awareness of the farmers. Farmers' characteristics and prior conditions were also explored.

Data Analysis

Changes in farmers' knowledge and awareness as a result of the intervention were analyzed by Wilcoxon Sign Ranks or paired t-tests. Independent samples t-tests were utilized to assess the differences in changed knowledge and awareness scores among farmers with dissimilar characteristics and prior conditions. The level of significance was set at 0.05.

Findings/Results

The Participants

Thirty-two farmers showed up at the University on the intervention day and consented to participate in this study. The majority of them were female (23, 71.9%). More than half (21, 65.6%) had some primary school education. The rest (11, 34.4%) had at least some of secondary school background. The average age of the participants was 44.3 ± 12.9 years old (range 23-70).

Effect of the Intervention on Knowledge and Awareness

Farmers' knowledge was assessed by means of a ten-question test. The results of their knowledge at pre-intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-month follow ups are shown in Table 1.

3 **Table 1** Participants' knowledge of pest management and biological control measures at pre-
 4 intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups
 5

Question	Number (per cent) correctly answered				
	Pre- intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three- month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
1. When is the appropriate time for safely harvesting agricultural produce after chemical application?	20 (62.5)	27 (84.4) ^{a,*}	9 (64.3)	1 (10.0) ^{c,*}	10 (83.3)
2. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be the cause of diseases in plants?	23 (71.9)	24 (75.0)	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
3. Can plants be induced against diseases?	10 (31.3)	16 (50.0) ^{a,*}	6 (42.9)	4 (40.0)	5 (41.7)
4. What is "biological control?"	11 (34.4)	17 (53.1) ^{a,*}	2 (14.3) ^{c,*}	3 (30.0)	4 (33.3)

5 **Table 1** (cont.)

Question	Number (per cent) correctly answered				
	Pre- intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three- month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
5. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be beneficial to the plants?	13 (40.6)	26 (81.3) ^{a,**}	10 (71.4)	5 (50.0)	12 (100.0) c,*
6. Is there any measure besides chemical application to control plant diseases?	24 (75.0)	28 (87.5)	12 (85.7)	7 (70.0)	10 (83.3)
7. What is "PGPR?"	1 (3.1)	27 (84.4) ^{a,**}	11 (78.6)	7 (70.0)	10 (83.3)
8. What is the benefit of PGPR to the plants?	5 (15.6)	27 (84.4) ^{a,**}	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
9. What is <u>not</u> the benefit of PGPR to the plants?	5 (15.6)	25 (78.1) ^{a,**}	11 (78.6)	9 (90.0)	9 (75.0)
10. How should PGPR be applied to the plants?	4 (12.5)	30 (93.8) ^{a,**}	14 (100.0)	9 (90.0)	10 (83.3)
Total score±SD	3.63±1.98	7.72±1.84 ^{b,**}	7.21±1.80	6.22±2.28	7.67±2.39

^a Wilcoxon Signed Ranks Test, compared with pre-intervention^b Paired Samples t Test, compared with pre-intervention^c Wilcoxon Signed Ranks Test, compared with immediately after intervention

* p<0.05 ** p<0.001

1 Table 1 indicated that, at pre-intervention, the majority of participants (60-75%) accurately
2 answered questions 1, 2, and 6, whereas approximately 30-40% had already comprehended questions
3 3, 4, and 5. Very few were able to answer questions 7, 8, 9, and 10, which were specific knowledge
4 regarding PGPR technique. Immediately after the intervention, every question in the test was correctly
5 identified by more than 75% of the farmers, except for questions 3 and 4, which were related to
6 general knowledge about pathogens and biological control where approximately half of the farmers
7 obtained correct answers. However, this was significantly higher compared to pre-intervention (50.0
8 versus 31.3% for question 3, and 53.1 versus 34.4% for question 4). Correspondingly, total
9 knowledge scores increased significantly ($p<0.001$) after the intervention. This level of knowledge
10 appeared to persist at follow-ups.

1 Before the intervention, the majority of participants exhibited positive feelings about the use
2 of pesticides (Table 2). For example, 34% agreed that “In general, pesticides do not harm the farmers
3 who apply them.” Even though most of the farmers (97%) believed that the residue of pesticides could
4 reside in the environment, half (50%) believed that the environment would be able to cleanse itself
5 rapidly. One-fourth of the farmers understood that the consumers would be safe ingesting these
6 produces, and about half (44%) believed that pesticides were highly reliable. More than half of the
7 farmers were convinced that their current pest-control methods were trustworthy (75%), and the use
8 of pesticides was cost-effective (60%). Positively for the aforementioned reasons, only a few (34%)
9 agreed with the idea of replacing their current methods with an alternative. The intervention could not
10 significantly alter their awareness, except for the item 7, “Pesticide residues can be degraded rapidly
11 in the environment.” That is, significantly fewer farmers agreed with this statement (18.7% at post-
12 intervention versus 50% at pre-intervention, $p<0.05$). Approximately the same levels of awareness
13 continued to at least six months

4 **Table 2** Participants' awareness of pest management and biological control measures at pre-
 5 intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups
 5

Statement	Number (per cent) agreed or strongly agreed				
	Pre-	Immediately	One-	Three-	Six-
	intervention (n=32)	after intervention (n=32)	month follow up (n=14)	month follow up (n=10)	month follow up (n=12)
1. In general, pesticides do not harm the farmers who apply them.	11 (34.4)	7 (21.9)	3 (21.4)	8 (80.0)	4 (33.3)
2. There should be some other alternatives to pesticides.	27 (84.4)	25 (78.1)	12 (85.7)	8 (80.0)	12 (100.0)
3. Pesticides can be resided in the soil and environment after application.	31 (96.9)	28 (87.6)	12 (85.7)	10 (100.0)	12 (100.0)
4. Pesticides are highly reliable in controlling pest.	14 (43.7)	16 (50.0)	7 (50.0)	5 (50.0)	7 (58.3)
5. Pesticides are cost-effective.	19 (59.4)	20 (62.6)	9 (64.3)	6 (60.0)	8 (66.7)
6. Pesticide-contaminated vegetables can be consumed without any harm.	8 (25.0)	8 (25.1)	6 (42.9)	7 (70.0)	5 (41.7)
7. Pesticide residues can be degraded rapidly in the environment.	16 (50.0)	6 (18.7) ^{a,*}	6 (42.9)	4 (40.0)	6 (50.0)

7 **Table 2 (cont.)**

Statement	Number (per cent) agreed or strongly agreed				
	Pre-	Immediately	One-	Three-	Six-
	intervention (n=32)	after intervention (n=32)	month follow up (n=14)	month follow up (n=10)	month follow up (n=12)
8. Currently, farmers already have a good measure for plant diseases control.	24 (75.0)	21 (65.7)	9 (64.3)	4 (40.0)	8 (66.7)
9. Any alternative method does not affect the current use of pesticides.	11 (34.4)	8 (25.0)	6 (42.9)	3 (30.0)	1 (16.7)
10. In general, farmers appreciate their use of pesticides for plant diseases control more than any other measures.	22 (68.8)	16 (50.0)	10 (71.4)	5 (50.0)	6 (50.0)

8 ^a Wilcoxon Signed Ranks Test, compared with pre-intervention
9 * p<0.01
0

1 We grouped the awareness items into three domains, namely (1) awareness of pesticide harm,
2 (2) awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use, and (3) awareness of alternatives to
3 pesticide use (Table 3). Higher scores indicated greater awareness of the issues under consideration.
4 Before the intervention, the participants showed moderate awareness levels in all domains, meaning
5 that they are indifferent of pesticide use. Immediately after the intervention, awareness of pesticide
6 harm increased significantly (p<0.05). However, their awareness of the ineffectiveness to costs of and
7 alternatives to pesticides remained the same after intervention. At one-, three- and six-month follow-

ups, the same levels of awareness in all domains were reported. Interestingly, however, the farmers exhibited significantly lower awareness of ineffectiveness to costs of pesticides at six-month follow-up compared with post-intervention. This drastic drop of awareness had not been evident at all in one- or three-month follow-up visits.

Table 3 Domains of awareness among participants at pre-intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups

Domain (item number)	Mean±SD score				
	Pre- intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three-month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
1. Awareness of pesticide harm (1, 3 ^c , 6, 7)	11.93±1.94	12.07±1.87 ^{a,*}	11.43±2.28	11.20±2.90	11.42±1.78
2. Awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use (4, 5)	4.87±1.41	4.48±1.40	4.79±1.81	4.30±1.70	2.50±0.67 ^{b,**}
3. Awareness of alternatives to pesticide use (2 ^c , 8, 9, 10)	10.00±1.70	10.45±1.99	10.08±2.47	13.20±3.94	11.08±1.44

^a Paired Samples t Test, compared with pre-intervention

^b Paired Samples t Test, compared with immediately after intervention

^c Reverted scale

* p<0.05

** p<0.005

2 *Factors Affecting the Change of Knowledge and Awareness:*

3 We hypothesized four prior conditions to affect the level of knowledge and awareness among
4 farmers, i.e., age (under/over 40), gender (male/female), educational level (some primary/some
5 secondary school), and frequency of chemical use (frequent/non-frequent users). The results are
6 shown in Table 4.

Table 4 Prior and changes of knowledge and awareness among participants of different age, gender, educational level and frequency of pesticide use

Hypothesized variable (valid n)	Mean±SD score							
	Prior knowledge	Δ knowledge ^b	Prior awareness of pesticide harm	Δ awareness of pesticide harm ^b	Prior awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use	Δ awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use ^b	Prior awareness of alternatives to pesticide use	Δ awareness of alternatives to pesticide use ^b
Age:								
≤ 40 (n=11)	4.36±1.80	4.36±1.36	10.00±1.73	1.45±1.92	5.27±1.56	.00±1.41	11.09±1.58	.64±1.21
> 40 (n=20)	3.05±1.85	4.15±1.60	9.75±1.71	.24±1.82	4.70±1.34	-.41±1.62	9.40±1.54 ^{a,**}	.24±1.85
Gender:								
Male (n=9)	3.55±1.94	4.44±1.59	8.89±1.45	1.33±2.50	4.55±1.59	.33±1.80	9.89±1.83	.89±2.15
Female (n=23)	3.65±2.03	3.96±1.69	10.17±1.64 ^{a,*}	.45±1.54	5.00±1.35	-.20±1.40	10.04±1.69	.20±1.28

278 **Table 4 (cont.)**

Hypothesized variable (valid n)	Mean±SD score									
	Prior knowledge	Δ knowledge ^b	Prior awareness of pesticide harm	Δ awareness of pesticide harm ^b	Prior awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use	Δ awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use ^b	Prior awareness of alternatives to pesticide use	Δ awareness of alternatives to pesticide use ^b		
Educational level:										
Primary school (n=21)	3.05±1.86	4.00±1.73	9.38±1.75	.84±1.67	4.77±1.44	.42±1.68	9.57±1.69	.42±1.74		
Secondary school (n=11)	4.73±1.80 ^{a,*}	4.27±1.56	10.64±1.21 ^{a,*}	.50±2.32	5.09±1.38	.10±1.10	10.82±1.47 ^{a,*}	.40±1.35		
Frequency of pesticide use:										
Frequent user (n=17)	3.41±1.97	4.29±1.53	9.88±1.61	.56±2.06	4.71±1.49	.31±1.45	10.24±1.82	.44±1.21		
Non-frequent user (n=11)	4.00±2.28	3.91±2.02	9.27±1.49	.91±1.87	4.82±1.33	.00±1.67	9.73±1.62	.64±2.06		

279 ^a Independent samples t test280 ^b Difference between immediately after intervention and pre-intervention scores

281 * p<0.05

282 ** p<0.005

Education Educational level was a very important factor to distinguish prior knowledge and awareness levels among farmers. Farmers who received at least some secondary school education exhibited significantly greater knowledge and awareness of pesticide safety and alternatives to pesticide use than those with primary school education ($p<0.05$).

Age At pre-intervention, awareness of alternative to pesticide use notably differed among farmers of dissimilar age groups ($p<0.005$). Younger farmers were more aware of other options than their older counterparts.

Gender With regard to gender, female farmers demonstrated considerably higher level of awareness about harms of pesticides than males ($p<0.05$).

Frequency of Pesticide Use Frequent users were defined as those who reported applying pesticides at least once per week. In this study, we found no statistical difference between knowledge and awareness among frequent and non-frequent users.

The results from Table 4 indicated no statistical difference in the change of knowledge and awareness scores across hypothesized variables. That is, farmers with different age, gender, educational level and frequency of pesticide use were able to obtain knowledge and awareness from this intervention. Note that the change in knowledge as a result of our intervention was more evident than that of awareness. All farmers of different characteristics gained approximately four points of knowledge scores after the intervention. This increase was statistically significant across subgroups (paired t tests, $p<0.001$, results not shown).

Conclusion, Recommendation, and Implications

In this study, our intervention had an only indiscernible impact on farmers' awareness. This may be because our intervention focused on providing farmers with information on pest management and biological control measures. As evident from our study, this piece of information was highly effective in changing farmers' knowledge regarding this issue. Knowledge, however, is only part of the picture when it comes to attitude or awareness formation. According to the tri-component model of attitudes (Ajzen, 1988), attitudes consist of the cognitive, affective and conative components. The

10 cognitive component of attitudes is formed by knowledge, direct experience and related information
11 about the object. The affective component is shaped by the person's assessment (emotions or feeling)
12 toward the object. Finally, the conative component is shaped by the individual's absolute and relative
13 intention to practice.

14 Providing information may cause a shift in farmers' knowledge. However, the other elements
15 need to be taken into consideration if one would like to achieve awareness formation. For example,
16 previous studies had shown that hands-on experience and participatory activities were effective in
17 changing farmers' perception and awareness (Wadsworth, 1990; Bacic et al., 2005). Likewise, regular
18 visits by change agents were proved to be effective in changing farmers' awareness and intention to
19 adopt new technologies (Williamson et al., 1988; Polson and Spencer, 1991; Schuck et al., 2002).
20 Luckily, part of our on-going project included experiments in three vegetable growers' fields. These
21 farmers can act as change agents in their communities. An in-depth interview with these farmers at the
22 six-month follow-up indicated that both the field owners and their neighbors somewhat learned about
23 PGPR, the innovation under consideration. They, in turn, were likely to be persuaded to adopt the
24 technology through experiencing firsthand what is actually happening in the field (data not shown). In
25 our opinion, this approach has an implication of being helpful in increasing awareness of innovations
26 in the future. Certainly, more work needs to be executed in our on-going project to be able to change
27 the awareness of the farmers, and to be able to move to the next stage of adoption process, i.e.,
28 persuasion.

29 At baseline, the farmers were indifferent about three domains of pest management measures,
30 i.e., harm, ineffectiveness to cost, and alternatives. The intervention could only change their
31 awareness of pesticide harm, the change that persisted to six months. We hypothesized that the
32 content of the intervention mainly emphasized the safety issues, but failed to discuss the other aspects
33 of pesticide use such as cost-benefit or alternatives thoroughly. Equally interesting, we found at the
34 six-month follow-up a drastic drop in the awareness of ineffectiveness to costs of pesticides. This
35 drop had not been apparent in one- or three-month follow-ups. One hypothesis would be that, the
36 interval between the three- and six-month follow-ups was too long to observe this dropping trend. In
37 addition, the months between our three- and six-month follow-ups (February and April) were the time

38 for farmers to prepare the area for next crop season in Thailand. During this time, pesticide companies
39 oftentimes heavily engage in various promotional activities to increase their sales. For this reason, it
40 may be possible that intense advertisement emphasizing the benefits of pesticides is communicated to
41 the farmers, causing an unusual escalation in positive attitudes toward using pesticide beyond our
42 expectation.

43 We found that farmers with more years in school were more knowledgeable of pest
44 management and biological control measures than those with less schooling. We also found that
45 female farmers were more concerned about pesticide safety than male farmers. Additionally, younger
46 farmers were more aware of alternatives to pesticides than older ones. These findings confirm the
47 presupposition of Diffusion of Innovations Theory that prior conditions play an important role in the
48 process of adoption. However, we did not find at pre-intervention any statistical difference between
49 knowledge and awareness levels among farmers of different frequencies of pesticide use. This finding
50 may indicate that some factors besides knowledge and awareness were critical in distinguishing
51 farmers' pesticide use behavior. In other words, they knew and were aware that pesticides were
52 harmful, but still used them. Data from our interview with 32 farmers on the intervention day revealed
53 that serious plant disease epidemic during that particular season was the main justification for them to
54 use pesticide aggressively (data not shown). We hypothesized, then, that lack of effective alternatives
55 was the main factor in determining the use of pesticides among these farmers.

56 The last issue concerns the applicability of the theory itself. Since Diffusion of Innovations
57 Theory was created in western culture environment, there is a possibility that the theory may not be
58 appropriately applied in Thai culture. Future studies should also address the issue about cultural
59 implications and applications of the theory.

0 We conclude that our intervention had a significantly positive impact on farmers' knowledge
1 of pest management and biological control measures. This change was robust, and persisted at least
2 six months. In addition, farmers of different age, gender, education level and frequency of pesticide
3 use were able to gain knowledge from our intervention. This indicated that our intervention was
4 suitable for farmers of various backgrounds. However, our intervention was not enough to increase

farmers' awareness of the issues, except a minor improvement in awareness of pesticide harm. This result was consistent across farmers of different characteristics.

Gaining knowledge and awareness about the innovation helps a process of adoption. This process, therefore, potentially increases a chance of successful technology diffusion. This study showed that the innovators could arrange potential adopters to obtain an early exposure to the technology regardless of the stage of its development. In this case, PGPR was still in its early development stage when the study took place. Our on-going study, therefore, will be a promising step in introducing PGPR application.

Acknowledgements

We are grateful to the industrious help of Amornlak Preechaharn, Chuanchom Thananithisak Duanghathai Janchua, Nantawarn Kittikannakorn, Naruemon Bumrungsawad, Ratree Manthaisong, and Supachai Jirakoup in data collection process. Sincere appreciation goes to our financial support agencies: the Thailand Research Fund (grant no. RSA4680006), and Naresuan University.

References

- Adesina, A. A., & Zinnah, M. E. (1993). Technology characteristics, farmers' perceptions and adoption decisions: A tobit model application in Sierra Leone. *Agricultural Economics*, 9, 297-311.
- Adesina, A. A., & Baidu-Forson, J. (1995). Farmer perception and adoption of new agriculture technology: Evidence from analyses in Burkina Faso and Guinea, West Africa. *Agricultural Economics*, 13, 1-9.
- Ajzen, I. (1988). *Attitudes, Personality, and Behavior*. Chicago, IL: Dorsey Press.
- Bacic, I. L. Z., Rossister, D. G., & Bregt, A. K. (2005). Using spatial information to improve collective understanding of shared environmental problems at watershed level. *Landscape and Urban Planning*, in press.
- Batz, F. J., Peters, K. J., & Janssen, W. (1999). The influence of technology characteristics on the rate and speed of adoption. *Agricultural Economics*, 21, 121-130.

- 93 Black, A. W., & Reeve, I. (1993). Participation in Landcare groups: The relative importance of
94 attitudinal and situational factors. *Journal of Environmental Management*, 39, 51-71.
- 95 Chitere, P. A., & Van Doorne, J. H. (1985). Extension education and farmers' performance in
96 improved crop farming in Kakamega district, Kenya. *Agricultural Administration*, 18, 39-55.
- 97 Daskalopoulou, I., & Petrou, A. (2002). Utilising a farm typology to identify potential adopters of
98 alternative farming activities in Greek agriculture. *Journal of Rural Studies*, 18, 95-103.
- 99 De Souza Filho, H. M., Young, T., & Burton, M. P. (1999). Factors influencing the adoption of
00 sustainable agricultural technologies. *Technological Forecasting and Social Change*, 60, 97-
01 112.
- 02 Fliegel, F. C., & Kivlin, J. E. (1966). Farmer's perception of farm practice attributes. *Rural Sociology*,
03 31, 197-206.
- 04 Fujisaka, S. (1994). Learning from six reasons why farmers do not adopt innovations intended to
05 improve sustainability of upland agriculture. *Agricultural Systems*, 46, 409-425.
- 06 Garforth, C., & Usher, R. (1997). Promotion and uptake pathways for research output: A review of
07 analytical frameworks and communication channels. *Agricultural Systems*, 55, 301-322.
- 08 Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. K., & Pasternak, J. J. (1994). Does the enzyme 1-
09 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase play a role in plant growth-promotion by
10 *Pseudomonas putida* GR12-2? In M.H. Ryder, P.M. Stephen, & G. D. Bowen (Eds.),
11 *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. (pp. 150-152). Adelaide, Australia:
12 Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- 13 Hebbler, K. P., Davey, A. G., Merrin, J., & Dart, P. J. (1992). Rhizobacteria of maize antagonistic to
14 *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: Colonization of rhizosphere and roots.
15 *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 989-997.
- 16 Huaysungnoen, N., & Yeesoonpan, N. (1999). *The comparative study of serum cholinesterase activity*
17 *between Thai agricultural workers and healthy volunteers* (Research Report). Phitsanulok.
18 Thailand: Naresuan University. (in Thai with English abstract)
- 19 Jetiyanon, K., & Kloepper, J. W. (2002). Mixtures of PGPR for induction of systemic resistance
20 against multiple plant diseases. *Biological Control*, 24, 285-291.

- Jetiyanon, K., Fowler, W. D., & Kloepper, J. W. (2003). Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Disease*, 87, 1390-1394.
- Kanato, M. (1998). Health risk associated with hazardous pesticide use among Thai agriculture workers in 30 rural communities. *Journal of Clinical Epidemiology*, 51(Suppl. 1), S23.
- Kim, D. S., Cook, R. J., & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 551-558.
- Kloepper, J. W., Scher, F. M., Laliberte, M., & Tipping, B. (1986). Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In T. R. Swinburne (Ed.), *Iron, siderophore, and plant disease*. (pp.155-164). New York: Plenum Publishing Corp.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*, 7, 39-43.
- Lambert, B., & Joos, H. (1989). Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends Biotechnology*, 7, 215-219.
- Lapar, M. Lucila A., & Pandey S. (1999). Adoption of soil conservation: the case of the Philippine uplands. *Agricultural Economics*, 21, 241-256.
- Liu, L., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1995)a. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85, 695-698.
- Liu, L., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1995)b. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85, 1064-1068.
- Ministry of Agriculture and Cooperatives, Office of Agricultural Economics, Agricultural Regulatory Division. (2005). *Economics and Agricultural Data (Imported Pesticides)*. Retrieved June 6, 2005, from <http://www.oae.go.th/statistic/import/imPTC.xls>.
- Ministry of Public Health, Food and Drug Administration, Chemical Safety Section, Intergovernmental Forum on Chemical Safety. (2004). *Health Risk Assessment of*

Agricultural Workers Using Chemical Pesticides. Nonthaburi, Thailand: Ministry of Public Health.

Morris, J., Mills, J., & Crawford I. M. (2000). Promoting farmer uptake of Agri-Environment Schemes: The countryside stewardship arable options scheme. *Land Use Policy*, 17, 241-254.

Office of the Prime Minister, Office of the National Economic and Social Development Board. (2001). *The Ninth National Economic and Social Development Plan (2002-2006)*. Bangkok, Thailand: Suksapan Bhanich. (in Thai)

Polson, R. A., & Spencer, D. S. C. (1991). The technology adoption process in subsistence agriculture: The case of cassava in southwestern Nigeria. *Agricultural Systems*, 36, 65-78.

Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S., & Kloepper, J. W. (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*, 80, 891-894.

Reece, J. D., & Sumberg, J. (2003). More clients, less resources: toward a new conceptual framework for agricultural research in marginal areas. *Technovation*, 23, 409-421.

Rodriguez, F., & Pfender, W. F. (1997). Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and in planta. *Phytopathology*, 87, 614-621.

Rogers, E. M. (1983). *Diffusion of Innovations*. (3rd ed.). London: Collier Macmillan.

Schuck, E. C., Nganje, W., & Yantio, D. (2002). The role of land tenure and extension education in the adoption of slash and burn agriculture. *Ecological Economics*, 43, 61-70.

Shiferaw, B., & Holden, S. T. (1998). Resource degradation and adoption of land conservation technologies in the Ethiopian Highlands: A case study in Andit Tid, North Shewa. *Agricultural Economics*, 18, 233-247.

- 1 Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81, 728-733.
- Wadsworth, J. (1990). Developing efficient extension strategies: Results of an experiment involving Costa Rican livestock producers. *Agricultural Systems*, 34, 259-275.
- Warriner, G. K., & Moul, T.M. (1992). Kinship and personal communication network influences on the adoption of agriculture conservation technology. *Journal of Rural Studies*, 8, 279-291.
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1992). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81, 1508-1512.
- Williamson, N. B., Burton, M. J., Brown, W. B., Baumann, L. E., & Farnsworth, R. J. (1988). Changes in mastitis management practices associated with client education, and the effects of adoption of recommended mastitis control procedures on herd milk production. *Preventive Veterinary Medicine*, 5, 213-223.
- Zhang, S., Xu, W., Yan, Z., & Mei, R. (1996). Research and commercialization of yield-increasing bacteria in China. In W. H Tang, R. J. Cook, & A. D. Rovira (Eds.), *Advances in Biological Control of Plant Diseases* (pp. 47-53). Beijing, China: China Agriculture University Press.

Similarity of Early Defensive Enzymes Induced by PGPR Mixtures in Different Plant/Pathosystems

Kanchalee Jetiyanon *

**Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Natural Resources, and
Environmental Sciences, Naresuan University, Muang, Phitsanulok, 65000*

Abstract— Two consecutive years of field trials on different grower's locations showed that compatible *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a and *B. pumilus* strain IN937b consistently provided broad spectrum against multiple indigenous diseases. The objective of this study was to investigate the similarity of early defensive enzymes induced by PGPR mixtures (IN937a+IN937b) in different plant/pathosystems. Four plant/pathosystems including tomato/*Sclerotium rolfii*, long cayenne pepper/*S. rolfii*, tomato/*Ralstonia solanacearum*, and long cayenne pepper/*Colletotrichum gloeosporioides* were tested. Each plant/pathosystem was examined independently at least twice in the greenhouse with factorial randomized complete block design, at least 5 replications. Treatments consisted of non-challenge control, challenge control, and PGPR mixtures. The factor was the day before and after challenge with pathogen. Peroxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD) activities were investigated. Disease incidence or severity of particular plant/pathosystem was recorded at the end of experiments. The results consistently revealed that plants in all pathosystems induced by PGPR mixtures had a significant reduction of disease incidence or severity (approximately 41-50%) compared to challenge control. Substantial elevation of PO and SOD activities in PGPR mixtures of all pathosystems were found during early pathogen inoculation compared to challenge control. Low levels of natural PO and SOD activities in non-challenge control were found throughout the experiments. This indicated that PGPR mixtures (IN937a+IN937b) elicited two early defensive enzymes, i.e., PO and SOD, in association with disease resistance in four different plant/pathosystems.

Keywords—early defensive enzymes, PGPR mixtures, peroxidase, superoxide dismutase
