รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประสิทธิภาพของสารกรองที่ผลิตจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F221-B ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

Efficacy of culture filtrate produced by *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in hydroponics*

รองศาสตราจารย์ ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประสิทธิภาพของสารกรองที่ผลิตจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F221-B ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

Efficacy of culture filtrate produced by *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in hydroponics*

รองศาสตราจารย์ ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร

RCH
ถ12289
2559

.b 12828646
.i

สาขาหมู่.....
เลขทะเบียน 145222
วัน.เดือน.ปี 31 ส.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพของสารกรองที่ผลิตจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F221-B ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

แหล่งเงิน เงินงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2559

จำนวนเงินที่ได้รับทุนสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **เริ่มตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2558 **ถึง** 31 กันยายน 2559

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ณิมนันต์ เจนอักษร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ที่ผลิตได้จากเชื้อ non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata* (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (F221-R, F442-G), *Rhizoctonia solani* (R11, R12), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) ในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์ จากการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay พบว่า สารกรอง (CF) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 20-39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการทดสอบ spore germination test พบว่าสารกรองความเข้มข้น 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia lunata* (C11, C12) ได้ดีที่สุด ซึ่งสารดังกล่าวมีผลทำให้สปอร์ของเชื้อทดสอบนั้นมีความผิดปกติไปจากเดิม เช่น เกิดการพองบวม และสลายตัวของสปอร์ เป็นต้น จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusariun oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ในระบบไฮโดรโพนิกส์ พบว่า กรรมวิธีที่ใส่ด้วยสารกรอง (CF) และ spore suspension ของ F221-B มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้ 90 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้

คำสำคัญ: Culture filtrate (CF), non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B), โรครากเน่าและเหี่ยว, ไฮโดรโพนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Efficacy of culture filtrate produced by *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in hydroponics*

Researcher: Assoc.Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn

Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the potential of culture filtrate (CF) of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) against 10 plant pathogenic fungi namely, *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) and *R. solani* (R11, R12) *in vitro* and *Fusarium* root rot disease in hydroponics. *In vitro* antifungal activity analysis indicated that all test concentrations of F221-B culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth of all tested fungal pathogens less than 39 % over control. Interestingly, the CF at all test concentrations revealed the greatest spore germination inhibition 100% over control against F113, F221-R and F422-G whereas spore germinations of C11 and C12 were completely inhibited by the CF at the concentrations of 60, 80 and 100%. In addition, spore abnormalities such as swelling and lysis were noted. Regard to antifungal analysis in hydroponics, the most striking and remarkable result was obtained. The non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce more than 90% and producing significantly better growth than that in non-treated lettuces. Moreover, no significant degree of difference in terms of lettuce growth was noted between using culture filtrate and spore suspension of F221-B.

Keywords: Culture filtrate (CF), non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B), root rot and wilt, hydroponics

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ประจำปี พ.ศ. 2559 ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สัญญาเลขที่ 2559-01-04-002 ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องในงานส่วนต่างๆ ที่ให้การสนับสนุน แนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ตลอดการดำเนินโครงการวิจัย ในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

รศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II
กิตติกรรมประกาศ..... III
สารบัญ..... IV
สารบัญตาราง..... VI
สารบัญภาพ..... VII
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1-2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 เชื้อรา *Fusarium* sp. 4
2.1.1 การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *F. oxysporum*..... 4
2.1.2 ลักษณะอาการโรคเหี่ยว..... 4-5
2.1.3 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* spp. 5
2.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช..... 6
2.2.1 การใช้เชื้อรา non-pathogenic *Fusarium* ในการควบคุมโรคพืช..... 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 9
3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช..... 9
3.2 การเตรียม Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B)..... 9
3.2.1 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สาเหตุโรคพืชโดยวิธี Agar well diffusion assay..... 9
3.2.2 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์ เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test..... 10
3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการ ควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์..... 11
บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 12
4.1 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สาเหตุโรคพืชโดยวิธี Agar well diffusion assay..... 12
4.2 การทดสอบสารกรองของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอก ของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test..... 14
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุม โรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์..... 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	19
5.1 สรุปผลการวิจัย	19
5.2 ข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	20
ประวัตินักวิจัย	25
ภาคผนวก	
บทความวิจัยที่ตีพิมพ์	31

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ตารางที่		หน้า
1.	ผลของสารกรอง culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี autoclave และ non-autoclave (3 วันหลังการปลูกเชื้อ).....	13
2.	ผลของสารกรอง culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	13
3.	ผลของสารกรอง culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี autoclave และ non-autoclave (12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ).....	14
4.	ความผิดปกติของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. (C11) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) หลังจากใส่สารกรองของเชื้อรา F221-B ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ).....	15
5.	ประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในรูปแบบของสารกรอง culture filtrate และ spore suspension ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรคเหี่ยวของผักสลัด (45 วันหลังการปลูกเชื้อ).....	17
6.	การเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในรูปแบบของสารกรอง culture filtrate และ spore suspension (45 วันหลังการปลูกเชื้อ)	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์สาเหตุที่สำคัญของโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ทำให้ทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตของพืชลดลง ยิ่งไปกว่านั้นถ้าโรคดังกล่าวนั้นเกิดการระบาดติดต่อกันเป็นระยะเวลานานๆ อาจส่งผลทำให้เกษตรกรผู้ปลูกนั้นขาดรายได้ อันเนื่องมาจากไม่สามารถปลูกพืชได้ จึงต้องหันมาพึ่งการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามถ้าคำนึงถึงปัญหาที่ตามมาแล้ว อาจจะเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ เพราะการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชนั้นในช่วงแรกๆ อาจจะได้ประสิทธิภาพดี แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป เชื้อราดังกล่าวก็อาจเกิดการดื้อยา (Baker, 1987; Cook, 1993; Tjamos *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 2003) แล้วทำให้สารเคมีเหล่านั้นใช้ไม่ได้ผล ส่งผลให้ต้องเกิดการเปลี่ยนชนิดของสารเคมีเข้ามาฉีดพ่นใหม่เรื่อยๆ แทนที่จะเป็นการลดการเกิดโรค แต่กลับทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเหล่านั้นมีการพัฒนาตัวเอง จากที่ไม่แสดงอาการโรคก็กลับทวีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกษตรกรต้องใช้สารเคมีควบคุมและป้องกันกำจัดโรคเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีก็ส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิต ทำให้เกิดการสะสมและตกค้างของสารเคมีภายในผลผลิต ทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายจากสารพิษที่ตกค้าง ด้วยเหตุนี้จึงได้มีนักวิจัยจำนวนมากได้คิดค้นหาแนวทางที่จะใช้ในการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี และไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม ไม่เป็นพิษต่อพืช ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน เพราะการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินนั้นไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่มากในการเพาะปลูก อีกทั้งเป็นการใช้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพให้ผลผลิตต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่สูงกว่าการปลูกพืชในดิน เพราะการปลูกลักษณะนี้จะเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาด้านโรคที่ติดมากับดิน (soilborne disease) ได้ (พรหมมาศ, 2548) จึงทำให้ไม่จำเป็นที่ต้องใช้สารเคมีเข้ามาฉีดพ่นเป็นจำนวนมากเหมือนกับการปลูกพืชในดิน แต่อย่างไรก็ตามการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินก็ยังประสบปัญหาด้านโรคได้ ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเข้ามาในระบบปลูก โดยเฉพาะโรคเหี่ยวและรากเน่าที่เกิดกับผักสลัด ซึ่งเคยมีการรายงานมาแล้วว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (ธิติ และคณะ, 2555) ทำให้เกิดโรคกับต้นกล้าไปจนถึงต้นโตได้ โดยพบแผลเกิดขึ้นบริเวณภายในลำต้น อาการโรคดังกล่าวนี้มีการระบาดอย่างกว้างขวางทั้งในดินและในฟาร์มไฮโดรโพนิกส์ทั้งในและต่างประเทศ (Elmer, 2004; Larkin and Fravel, 1998; Nel *et al.*, 2006)นักวิจัยหลายๆ ท่านจึงมีการคิดค้นหาวิธีการอื่นๆ เพื่อควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรค ซึ่งไม่มีผลเสียต่อสภาพแวดล้อมและไม่มีพิษตกค้างกับพืชและผลผลิตต่างๆ อีกทั้งยังสามารถที่จะช่วยลดการเกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวมะเขือเทศ โรคแอนแทรกโนสพริก และโรครากเน่าและโคนเน่าบีชรูท เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Kaur *et al.*, 2010; Howell, 2003; Song *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Kakvan *et al.*, 2013)

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช เช่น การใช้ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PCL 1760 เพื่อควบคุมโรคผลเน่าและรากเน่าของมะเขือเทศ พบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Fol) ได้ (Shamil *et al.*, 2009) สำหรับเชื้อราปฏิปักษ์อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย คือ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน ซึ่งมีคุณสมบัติและศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ 4 ลักษณะ คือ การแข่งขันด้านปัจจัยในการดำรงชีวิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช (competition) การเป็นปรสิต (parasitism) การสร้างสารทุติยภูมิ (antibiosis) และการชักนำให้พืชเกิดการต้านทาน (Vinale *et al.*, 2008) นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting fungus, PGPF) และชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (induction of resistance in plant) ตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อรา *F. equiseti* GF 191 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Horinouchi *et al.*, 2010) จากการศึกษาเบื้องต้นของ ธิติและคณะ (2556) พบว่าเชื้อ nonpathogenic *F. oxysporum* F221-B ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโพนิกส์ ซึ่งเป็นเชื้อที่น่าสนใจว่าสามารถช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัดสายพันธุ์ Cos, Green oak, Red oak, Butter head คะน้า และ ถั่วเขียว ในด้านของผลผลิต เช่น น้ำหนักสดต้นและราก ได้ดีกว่าพืชที่ไม่ทำการใส่เชื้อ F221-B ถึง 2 เท่า รวมไปถึงสามารถที่จะลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวและรากเน่าของผักสลัดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* ได้ โดยพบว่า น้ำหนักของผักสลัดยังมีน้ำหนักต้นที่ค่อนข้างสูงอยู่ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้คิดค้นเพื่อหาวิธีการอื่นๆ เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อในด้านการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เชื้อราสาเหตุโรค โดยจากการทดสอบ Dual-culture test ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา nonpathogenic *F. oxysporum* F221-B สามารถมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Thongkamngam *et al.*, 2013 unpublished) ส่วนกลไกการยับยั้งเชื้อราที่พบ ในช่วงแรกคือกลไก antibiosis โดยพบกลไกดังกล่าวในช่วงเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นจะมีกลไก competition เข้ามาปกคลุมกลไก antibiosis แทน ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาโดยละเอียดถึงกลไก antibiosis โดยกลไกดังกล่าวนี้จะประกอบด้วยสารพิษ เอนไซม์ และสารทุติยภูมิ ซึ่งสารดังกล่าวนั้นมีผลไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา และทำให้สปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้นเสื่อมสลายและผิดรูปร่างไปจากเดิม

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการประเมินศักยภาพของสาร Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา nonpathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B ต่อการเจริญทางเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B ต่อการควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษากลไก antibiosis ของเชื้อรา nonpathogenic *F. oxysporum* F221-B โดยละเอียดถึงสารที่เชื้อราสร้างขึ้นแล้วไปมีผลในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยนำสารที่ผ่านการกรองแล้วมาทำการฆ่าเชื้อใน 2 รูปแบบ คือการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave และการกรองผ่านด้วย microfilter เพื่อที่จะได้สารที่บริสุทธิ์ออกมา โดยไม่มี เส้นใย สปอร์ หรืออื่นๆ ผสมในสารที่ผ่านการกรองแล้ว เพื่อเป็นการยืนยันถึงคุณสมบัติของสารที่ได้อย่างแท้จริง ที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสาร secondary metabolites ที่เชื้อราสร้างขึ้นซึ่งจะทำการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา *Fusarium* spp.

2.1.1 การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *F. oxysporum* (Agrios, 2005)

เชื้อรา *F. oxysporum* จัดอยู่ใน

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Class Deuteromycetes

Order Moniliales

การจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* มีหลายสี พบตั้งแต่สีชีดขาว เหลือง ชมพู จนถึงม่วง และเจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ระหว่าง 6.5 – 7.0 ตามปกติเชื้อราจะสร้าง microconidia จำนวนมาก ซึ่ง microconidia มี 1 เซลล์ หรือ 2 เซลล์ รูปร่างต่างกันไปตั้งแต่รูปกลมจนถึงรูปไข่หรือรูปโค้งและมีขนาดตั้งแต่ 5-12 ×2.5-3.5 ไมโครเมตร (Burgess *et al.*, 1994) conidia จะสร้าง phialides ซึ่งเจริญจากด้านข้างของเส้นใย หรือจาก phaialides ที่เจริญมาจาก conidiophores สั้น ๆ ซึ่งแตกแขนงจากเส้นใย macroconidia จนกระทั่งเจริญเต็มที่พบว่ามี 3-5 septa รูปร่างส่วนใหญ่จะโค้งปลายเรียวส่วนน้อยจะยาวตรงและมีขนาดต่างกันไป macroconidia ขนาดของ macroconidia ที่พบตั้งแต่ 3 septa มีขนาด 27-46 × 3.5 ไมโครเมตร 4 septa มีขนาด 35-60 × 3-5 ไมโครเมตร และ 6-7 septa มีขนาด 50-66 × 3.5-5 ไมโครเมตร macroconidia ที่พบมาก ได้แก่ ขนาด 27-46 × 3.5 ไมโครเมตร 3 septa (Correll, 1991) การสร้าง chlamydospore จะสร้างจากส่วนปลายสุดหรือระหว่างกลางของเส้นใย อาจจะอยู่เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสายมีสีใส ผนังเรียบหรือขรุขระ (Booth, 1971)

2.1.2 ลักษณะอาการโรคเหี่ยว

อาการจะแสดงที่ใบล่างก่อนใบล่างจะเกิดอาการเหลือง อาจจะแสดงอาการเพียงด้านใดด้านหนึ่งของต้น เนื่องจากเชื้อราเข้าทำลายรากพืชเฉพาะ ซีกเดียวของต้นก่อน เมื่อรากถูกทำลายต้นก็จะเหี่ยวตาม Agrios, (2005) สาเหตุของการเหี่ยวจะเกิดเนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำและธาตุอาหารในลำต้นไม่สะดวกหรือหยุดชะงักลง โดยเมื่อเชื้อนี้เข้าไปอยู่ในท่ออาหารแล้วจะสร้างเอนไซม์พวก pectic methyl-esterase (PME) และ depolymerase (DP) enzymes ทั้งสองชนิดนี้จะทำลาย pectic substances ที่อยู่ในผนังเซลล์แล้วจะเข้าไปในชั้น parenchyma ของ xylem แล้วจะเกิดเป็น colloidal mass อุดอยู่ทั้งยังทำให้อัตราการคายน้ำ (transpiration) ของพืชลดลงด้วยในระยะนี้จะเกิดอาการเหี่ยวขั้นแรก ต่อไปเชื้อราจะสร้างสาร lycomerasmin และ fusaric acid ขึ้น ทำให้เกิดอาการเหี่ยวตลอด (permanent wilting) (เสน่ห์ และอุดม, 2547) และจะเริ่มวงจรชีวิตของเชื้อเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ conidia ของเชื้อจะสร้าง germ tube และเส้นใยจะงอกแทงผ่านปลายราก โดยตรงหรือผ่านทางบาดแผล เส้นใยจะเจริญผ่าน cortex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของรากไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อเจริญมาถึงท่อลำเลียงก็จะแผ่ขยายไปถึง ลำต้น ยอด ของพืชใน ขณะที่อยู่ในท่อลำเลียง เส้นใยจะมีการแตกแขนงและสร้าง microconidia ซึ่งจะถูกปลดปล่อยและ แพร่กระจายไปยังท่อลำเลียงของพืช เส้นใยจะแทงผ่านไปเซลล์ ที่อยู่ติดกันและจะผลิต microconidia ต่อไป

2.1.3 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* spp.

เชื้อรา *Fusarium* spp. จะงอก germ tube ของสปอร์หรือเส้นใยเข้าไปในรากพืชผ่านทางปลาย ราก (root tip) หรือทางบาดแผล จากนั้นเชื้อราจะสร้างเอนไซม์สำหรับสลายผนังเซลล์ของพืช ซึ่งเป็นขั้นตอน สำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อราภายในพืช ตัวอย่างของเอนไซม์ที่เชื้อรา *F. oxysporum* สร้างขึ้นได้แก่ pectate lyase (PL) และ poly-galacturonase (PG) ซึ่งสามารถสลายโครงสร้างของ pectin และ homogalac ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญผนังเซลล์พืชตามลำดับ นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์ endoxylanase ใน การสลายพอลิเมอร์ของ xylam ที่อยู่ในโครงสร้างของ hemicelluloses อันเป็นองค์ประกอบหลักอีกชนิด หนึ่งของผนังเซลล์พืช (Nelson *et al.*, 1983)

เมื่อเชื้อราผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เส้นใยเชื้อราจะเจริญเติบโตโดยแตกกิ่งก้านสาขาและ สปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidia ขึ้นภายในเซลล์พืช ซึ่งสามารถแพร่กระจายจากเซลล์สู่เซลล์โดยการ สร้างเอนไซม์ขึ้นย่อยผนังเซลล์และเมื่อเส้นใยเจริญไปถึงท่อเลี้ยงน้ำและอาหาร สปอร์ที่เส้นใยสร้างขึ้นสู่ด้านบน ของลำต้นโดยอาศัยการไหลของน้ำและสารอาหาร (sap stream) ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อราจาก ล่างขึ้นบน เมื่อมีการสร้างเส้นใยและสปอร์มากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการอุดตันของท่อลำเลียง น้ำและสารอาหาร ไม่สามารถส่งผ่านไปยังส่วนต่างๆ ของพืชขาดน้ำจะเหี่ยวนำให้เกิดการปิดของปากใบ (stomata) ทำให้ใบ เหี่ยวและเหลือง นอกจากนี้การขาดสารอาหารภายในพืชเนื่องจากการอุดตันของท่อลำเอียงอาหาร จะส่งผลให้ พืชเจริญเติบโตช้าและแคระแกร็นด้วย Agrios, (2005)

เมื่อเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสามารถแทงทะลุออกมาสู่ผิวนอกของพืชอาศัย จะมีการปลดปล่อย สปอร์ 3 ชนิดออกมาสู่แวดล้อมภายนอก เส้นใยบางส่วนและ chlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ที่ทนต่อ สภาพแวดล้อมจะยังคงเหลือรอดอยู่ในพืชที่ตายแล้วและสามารถอาศัยอยู่ในดินแม้ไม่มีพืชอาศัย เมื่อถึงฤดู เพาะปลูกอีกครั้งและมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม chlamydospore จะสร้าง germ tube เข้าไปในรากพืช เกิดสร้างเส้นใยและสปอร์ภายในพืชจนนำไปสู่การเกิดโรคเหี่ยว *Fusarium* spp. อีกครั้ง (Kidane, 2008)

2.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ลด ปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช เพราะการใช้สารเคมีนั้นมีข้อจำกัด อีกทั้งยังส่งผลตกค้างต่อผลผลิต ทางการเกษตร ทำให้ส่งผลต่อตัวเกษตรกรและผู้บริโภคให้เกิดอันตราย ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องหันมาใช้การ ป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธีเป็นหลัก คือ การใช้เชื้อราปฏิปักษ์และการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพราะการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อดังกล่าวสามารถป้องกันกำจัดเชื้อได้ยาวนานไม่เกิดการตกค้างของสารพิษทำให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ต่อไป

2.2.1 การใช้เชื้อรา non-pathogenic *Fusarium* ในการควบคุมโรคพืช

ในอดีตที่ผ่านมามีการใช้จุลินทรีย์หลายหลากชนิดในการป้องกันกำจัดและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช อาทิเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., *Cheatomium* spp. และ Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* เป็นต้น การใช้เชื้อปฏิปักษ์ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพราะเชื้อดังกล่าวมีกลไกในการป้องกันกำจัดโรคได้หลากหลายชนิด เช่น การแข่งขัน การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต การชักนำให้พืชเกิดการต้านทาน และการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช กลไกเหล่านี้ถือว่าเป็นสิ่งที่สำคัญของเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งจากการรวบรวมผลงานวิจัยของหลายๆ ท่านได้ทำการทดลองทดสอบการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* หลากหลายชนิด มาเพื่อควบคุมโรคพืช เช่น โรครากเน่า และโรคเหี่ยว (Benhamou *et al.*, 2002; Olivain *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2006; Musavi and Balakrishna, 2014) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า เชื้อราดังกล่าวยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด เช่น *Pythium ultimum* (Benhamou *et al.*, 2002) และการที่เส้นใยไปเจริญแก่งแย่งธาตุอาหารของเชื้อรา *P. ultimum* ที่เป็นแบบ mycoparasitism ยิ่งไปกว่านั้น Fo47 ยังสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงยังส่งผลกระตุ้นให้พืชมีเกิดการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ ซึ่งมีคุณสมบัติและศักยภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Olivain *et al.* (2005) ทดสอบการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ในการควบคุมโรครากเน่าของมะเขือเทศที่ปลูกในดิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ อีกทั้งยังสามารถเข้าครอบครองรากของมะเขือเทศ ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคนั้นลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และ Silva and Bettiol (2005) ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* จำนวน 9 สายพันธุ์ คือ 141/3, 233, 233/1, 245, 245/1, 251, 251/2, 251/5, และ 257 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศ พบว่า เชื้อราทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้อยู่ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์ (Abeysinghe, 2006) หลังจากนั้นได้มีหลายๆงานวิจัย ที่ได้มุ่งเน้นนำสารที่เป็นแบบ secondary metabolites มาใช้ในการทดสอบต่อเพื่อใช้พัฒนาหรือแทนการใช้เชื้อในรูปแบบสด

Siddiqui and Shaukat (2003) ได้ทดสอบผลของ culture filtrate (CF) ของเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 และ pME3424 และสารสกัดจากเชื้อรา non-pathogenic *F. solani* FS5 ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* พบว่าการใช้ทั้ง CF และ สารสกัดของเชื้อรามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยโดยสามารถยับยั้งได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์

Rodriguez *et al.* (2006) ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* S6 ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โดยทำการประเมินด้วยวิธี dual cultures test พบว่าสามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 78 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบสาร cyclosporine A ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างการทดสอบ หลังจากนั้นได้ทดสอบการยับยั้งการงอกของ sclerotia พบว่าสารดังกล่าวนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง sclerotia

Kaur *et al.* (2003) ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* และ *Pseudomonas fluorescent* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นถั่ว ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* พบว่าเมื่อทำการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ร่วมกัน สามารถการเกิดโรคได้ 15-30 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 30 วันแรก แต่เมื่อระยะเวลาถึงวันที่ 60 พบว่าพืชแสดงการเกิดโรคเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด

Nahalkova *et al.* (2008) ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ Fo47 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่ปลูกในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโพนิกส์ พบว่า Fo47 สามารถเข้าครอบครองรากของต้นมะเขือเทศทำให้พืชเกิดการชักนำให้เกิดการต้านทานโรคเหี่ยว โดย Fo47 ใช้เส้นใยเจริญอยู่ภายในเนื้อเยื่อของรากพืชทำให้เป็นการสกัดกั้นการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค

Horinouchi *et al.* (2008) ทำการทดสอบเชื้อรา *Fusarium equiseti* GF 191 และ biodegradable pots (BPs) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) ในแปลงปลูกมะเขือเทศ พบว่า การใช้ร่วมกันระหว่าง GF 191+BPs สามารถลดการเกิดสีภายในท่อลำเลียงน้ำและเนื้อเยื่อของต้นมะเขือเทศได้ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุพืช 131 วัน และเมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 149 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้สูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์

Mwaura *et al.* (2009) ได้ทดสอบการสร้างสาร secondary metabolites ที่ผลิตจากเชื้อรา endophytic *F. oxysporum* จำนวน 5 ชนิด ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Helicotylenchus multicinctus* ของกล้วย พบว่า culture filtrate ของเชื้อราดังกล่าวมีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยได้ในเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง

Patil *et al.* (2011) จากการทดสอบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่า เชื้อดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้อยู่ในช่วง 24.19–40.32 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงเมื่อทำการทดสอบในสภาพไร่ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวได้ถึง 70-100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นสามารถทำให้เห็นค่าการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งความสูงและน้ำหนักของต้นมะเขือเทศ

Horinouchi *et al.* (2011) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อรา *Fusarium equiseti* GF 191 ที่มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อราที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Fungus: PGPF) โดยได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์และระบบปลูกพืชในดิน พบว่าเชื้อรา GF 191 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 66.7-88.6 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ramanatha and Vinodhkumar (2013) ได้คัดเลือกเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสาร secondary metabolites โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารที่ทำจากเมล็ดข้าวโพด หลังจากนั้นศึกษาถึงคุณสมบัติในการสร้างสารของเชื้อโดยทำการกรองสารที่ได้หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาตรวจสอบด้วยวิธี TLC โดยพบว่าสารที่ปรากฏมีค่า Rf เท่ากับ 0.651 พบว่าเป็นสาร Fumonisin หลังจากนั้นนำไปตรวจโดยวิเคราะห์ปริมาณของสารโดยเครื่อง HPLC พบว่าเป็นสารกลุ่ม Fumonisin โดยมีปริมาณเท่ากับ 4.617 mg หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย 1H & 13C NMR analysis โดยพบว่าเมื่อทำการตรวจสอบถึงการสร้างสาร secondary metabolites มีลักษณะคล้ายคลึงกับสาร Fumonisin ($C_{33}H_{59}NO_{15}$)

Musavi and Balakrishnan (2014) ได้ทดสอบเชื้อรา endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06 เป็นเชื้อราที่ไม่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว อีกทั้งยังสามารถสร้างสาร secondary metabolites โดยได้นำเอาสารดังกล่าวมาทดสอบในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) และ *Candida albicans* (ATCC 69548) โดยใช้อัตราความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) พบว่าความเข้มข้นที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษากลไก antibiosis ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) โดยละเอียดถึงการสร้างสาร secondary metabolites ซึ่งประกอบด้วยสารพิษ เอนไซม์ และสารทุติยภูมิ ซึ่งสารดังกล่าวนั้นมีผลไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา และทำให้สปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้นเสื่อมสลายและผิดรูปร่างไปจากเดิม ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว คือ เมล็ดและใบข้าว ตัวอย่างผักสลัดสายพันธุ์ Cos และ Green oak ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ ที่แสดงอาการของโรค นำมาแยกโดยวิธีการ Tissue transplanting technique และ Dilution plate ลงบนอาหาร Water agar (WA) และ selective media สังเกตการเจริญของเชื้อราและย้ายลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเก็บเชื้อราที่แยกได้เลี้ยงลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA slant)

3.2 การเตรียม Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B)

ในการทดลองนี้จะมุ่งเน้นถึงประสิทธิภาพของ non-volatile extracellular metabolite ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 10 ชนิด ดังนั้นจึงเตรียม CF ของเชื้อราปฏิปักษ์โดยนำเชื้อ *F. oxysporum* (F221-B) ที่มีกลไกการยับยั้งเป็นแบบ antibiosis จากวิธี Dual-culture antagonistic test เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วัน จากนั้นทำการเจาะชิ้นวุ้น บริเวณขอบของโคโลนี จำนวน 5 ชิ้น มาเลี้ยงลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน จากนั้นกรองเอาเส้นใยออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 นำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอนเส้นใยและสปอร์ออก หลังจากนั้นนำ CF กรองผ่าน microfilter ขนาด 0.20 ไมโครเมตร แบ่ง CF ที่ผ่านกรองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ไม่ต้องฆ่าเชื้อ และส่วนที่ 2 ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave นำ CF ที่ได้จากทั้ง 2 ส่วนมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคต่อไป โดยดำเนินการทดสอบออกเป็น 3 วิธี ซึ่งดัดแปลงมาจาก Lorito *et al.* (1994) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.2.1 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Agar well diffusion assay (Fiddman and Rossall, 1993)

นำ CF ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แต่ใช้ microfilter กรองแทน หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยจัดการทดลองแบบ RCRD (Randomized completely randomized design) จำนวน 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด ลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บรรจุอยู่ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นให้ห่างจากเชื้อ 2 เซนติเมตร จำนวน 6 จุด ตามความเข้มข้นวางเป็นวงล้อมรอบเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าว นำชิ้นวุ้นที่เจาะออก ปล่อยทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง หยด CF แต่ละความเข้มข้นในปริมาณ 30 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อในทุก ๆ ความเข้มข้นของ CF และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

3.2.2 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test (Steinkellner and Mammeriler, 2005)

นำ CF ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ แต่ใช้ microfilter กรองแทน หยดลงบนสไลด์หลุมในปริมาณ 30 ไมโครลิตร ที่มี spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 5 ชนิด จากข้อ (1) ที่ความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml อยู่แล้ว 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสไลด์หลุมดังกล่าว ไปบ่มให้ความชื้นในกล่องพลาสติก เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidia ใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกของ conidia อย่างละ 100 สปอร์ เปรียบเทียบกับทุก ๆ กรรมวิธี พร้อมทั้งคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 5 ชนิด ที่เป็นผลมาจากประสิทธิภาพของ CF ของ *F. oxysporum* (F 221-B) ในแต่ละระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

นำ CF ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ที่มีประสิทธิภาพดีในการทดลอง Agar well diffusion assay และ spore germination test โดยคัดเลือก CF ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุดมาใช้ในการทดลอง โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ spore suspension ของเชื้อ F221-B มาเป็นตัวเปรียบเทียบอีกกรรมวิธีหนึ่ง เพื่อใช้เป็นการยืนยันผลในด้านการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวอีกครั้งหนึ่ง โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี ๆ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธี 1 Healthy Control (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธี 2 Inoculation control Pathogen 1×10^6 spore/ml

กรรมวิธี 3 Culture filtrate F221-B

กรรมวิธี 4 Culture filtrate F221-B + inoculation Pathogen 1×10^6 spore/ml

กรรมวิธี 5 Spore suspension 1×10^6 spore/ml F221-B

กรรมวิธี 6 Spore suspension 1×10^6 spore/ml F221-B + inoculation Pathogen 1×10^6 spore/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเมล็ดผักสลัด Cos บนฟองน้ำ และรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า EC = 1 ms/cm^2, pH = 5.8-6.2 (Benoit, 1992) เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายกล้าลงระบบปลูกพืชแบบ DRFT ซึ่งประกอบด้วยกระบะพลาสติกที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาตร 5 ลิตร ใส่ CF และ spore suspension ของเชื้อ F221-B ลงในกระบะปลูกพืช ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นอีก 3 วันปลูกเชื้อ ด้วย spore suspension (1×10^6 spore/ml) ของเชื้อ pathogen ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช

บันทึกผลการทดลอง

- วัดระดับความรุนแรงของโรค 6 ระดับ ระดับ 0 : ต้นพืชปกติไม่เป็นโรค รากสีขาว, ระดับ 1 : รากพืชมีสีน้ำตาลแดง, ระดับ 2 : รากพืชมีสีน้ำตาลแดงถึงเน่า ระดับ 3 : รากพืชมีอาการเน่า พืชมีอาการเหี่ยวชั่วคราว ระดับ 4 : รากพืชมีอาการเน่า พืชมีอาการเหี่ยวถาวร และ ระดับ 5 : ต้นพืชตาย
- วัดระดับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคในผักสลัด พร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ตามสูตรดังนี้

$$\%\ \text{การเกิดโรค [Disease incidence, DI]} = \frac{\text{จำนวนต้นที่แสดงอาการโรค}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

$$\%\ \text{ความรุนแรงของโรค [Disease severity, DS]} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นที่แสดงอาการโรค} \times \text{ระดับอาการโรค)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด}} \times 100$$

การเจริญเติบโตของผักสลัด

- น้ำหนักสดและแห้งของต้นผักสลัด

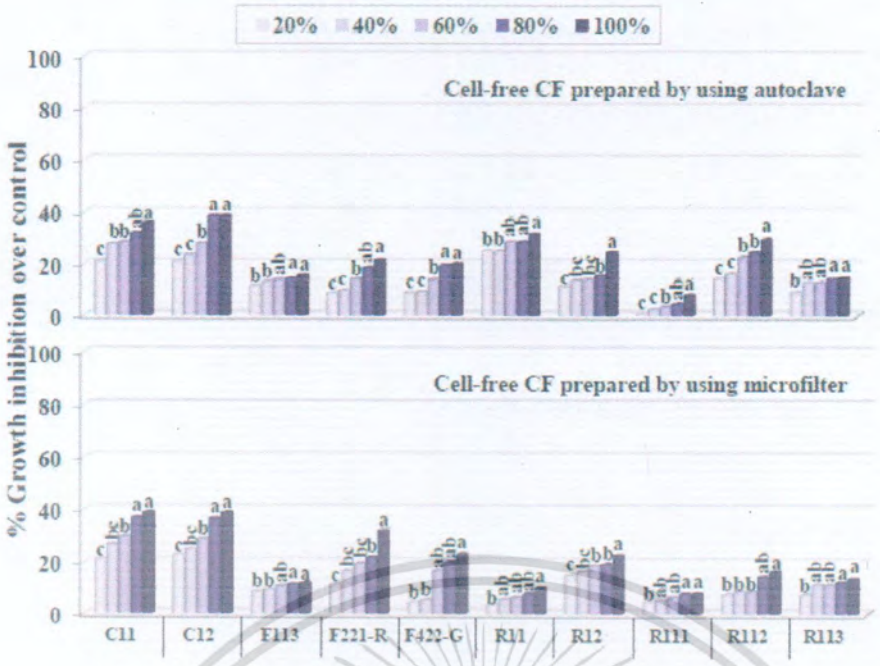
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

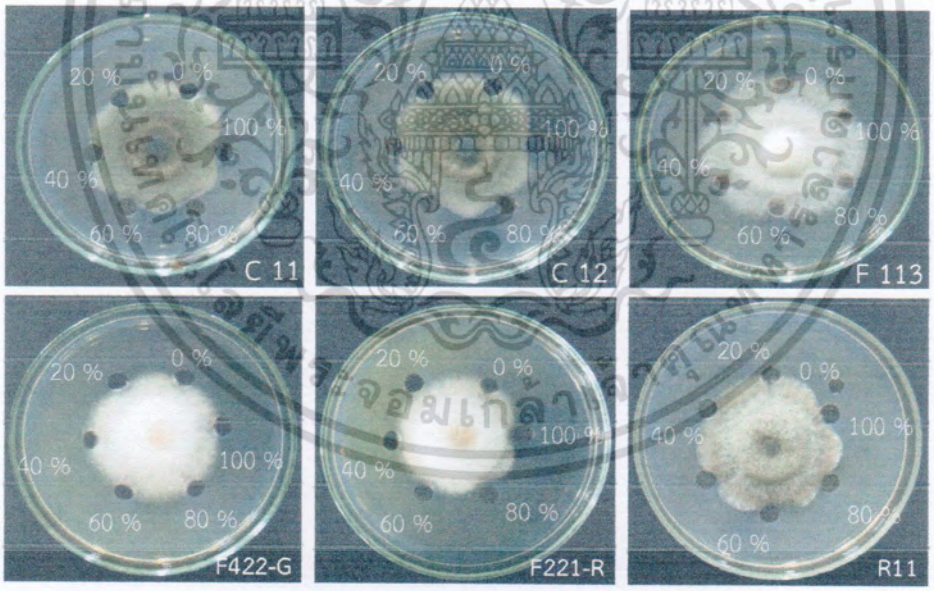
4.1 การทดสอบสารกรองของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Agar well diffusion assay

จากการทดสอบประสิทธิภาพ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 10 สายพันธุ์ ในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโพนิกส์ ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion assay โดยใช้ CF เชื้อรา F221-B 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 %) เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่ารูปแบบการฆ่าเชื้อทั้ง 2 รูปแบบมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้ออยู่ในช่วง 39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อนั้นจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของ CF ที่ใช้ในการทดสอบและเมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการฆ่าเชื้อทั้ง 2 รูปแบบ สามารถแบ่งกลุ่มการยับยั้งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด ประกอบด้วย เชื้อรา *Curvularia* sp. (C11, C12) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 20-39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1) กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปานกลาง ประกอบด้วย *Fusarium semitectum F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia solani* (R11,R12) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้น้อยที่สุด ประกอบด้วย *Rhizoctonia* sp. (R111, R112 และ R113) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง อยู่ที่ 6-15 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรค ความเข้มข้นที่ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al.* (2006) ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* S6 ต่อการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual cultures test ถึงการผลิตสาร secondary metabolites พบว่าสารที่ได้ดังกล่าวคือ cyclosporine A หลังจากนั้นได้ทดสอบการยับยั้งการงอกของ sclerotia พบว่าสารดังกล่าวนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง sclerotia และเส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 78 เปอร์เซ็นต์ และได้มีการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ได้ทดสอบเชื้อรา endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06 เป็นเชื้อราสามารถสร้างสาร secondary metabolites โดยได้ทดสอบในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) และ *Candida albicans* (ATCC 69548) โดยใช้อัตราความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) พบว่าความเข้มข้นที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ได้ (Musavi and Balakrishnan, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 ผลของสารกรอง culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน(0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี autoclave และ non-autoclave (3 วันหลังการปลูกเชื้อ)

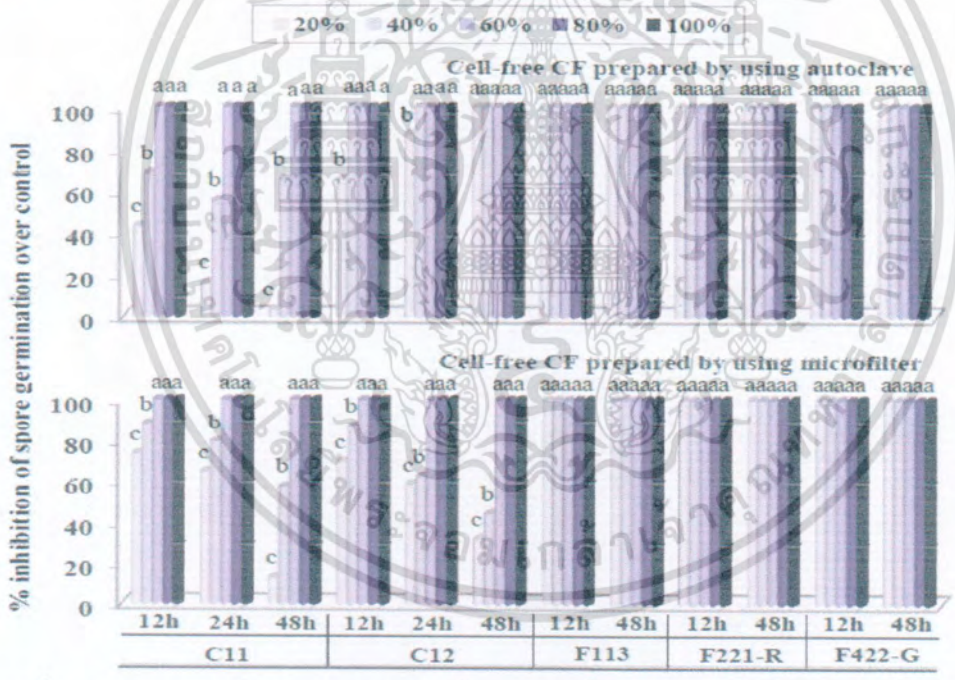


ภาพที่ 2 ผลของสารกรอง culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

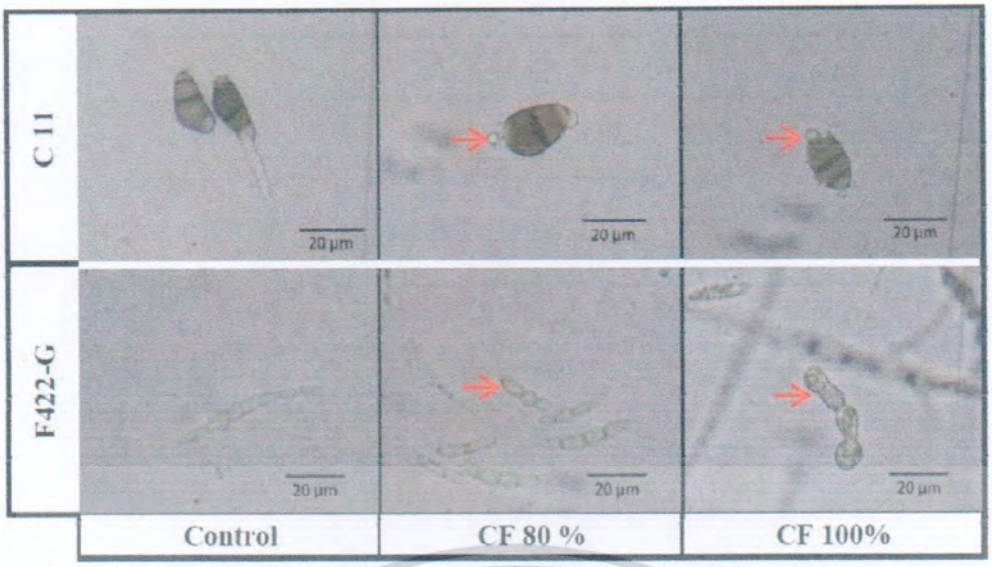
4.2 การทดสอบสารกรองของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) จากเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 5 ชนิด (*Curvularia* sp. (C11, C12), *Fusarium semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) โดยใช้รูปแบบการฆ่าเชื้อ 2 รูปแบบดังนี้ Autoclave และ Non-autoclave โดยใช้ CF เชื้อรา F221-B 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ทำการทดสอบโดยวิธี Spore germination test พบว่า โดยภาพรวม CF ของเชื้อ F221-B ที่ระดับความเข้มข้นสูง (80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ภาพที่ 3 มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้งหมด โดยทำให้สปอร์เชื้อผิดปกติไปเกิดอาการบวมและแตกสลายไปในที่สุด ส่วนในระดับความเข้มข้นต่ำ (20, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์) มีผลเพียงแค่ชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืช เฉพาะในช่วงแรกของการบ่มเชื้อเท่านั้น โดยเมื่อเวลาผ่านไป 12-48 ชั่วโมง สปอร์ของเชื้อดังกล่าวจะเริ่มงอกและมีเปอร์เซ็นต์การงอกใกล้เคียงกับในกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามถึงแม้สปอร์จะงอกได้ แต่สปอร์ก็ยังแสดงลักษณะผิดปกติ คือ บวมและผิดรูปร่างไป (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ผลของสารกรอง Culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ที่ 6 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ต่อการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี autoclave และ non-autoclave (12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ความผิดปกติของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. (C11) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) หลังจากใส่สารกรองของเชื้อรา F221-B ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการคัดเลือกรูปแบบของการใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในวิธีการทดสอบ Agar well diffusion assay โดยนำ Culture filtrate ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการเพิ่มรูปแบบ Spore suspension (1×10^6 spore/ml) ที่ได้ผลในการทดลอง คุณสมบัติของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (unpubic) มาใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ ทดสอบโดยวิธี Root inoculation test พบว่า 7 วันหลังการปลูกเชื้อ กรรมวิธีที่ 4 ที่ใส่รูปแบบ CF of F221-B+F422-G และกรรมวิธีที่ 6 Spore suspension of F221-B+F422-G พบการเกิดโรคเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ทั้ง 2กรรมวิธี ที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 32 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงของโรค 6.6 และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคถึง 64 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 56.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปถึงวันที่ 14 และ 28 วันหลังการปลูกเชื้อพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคของกรรมวิธีที่ใส่รูปแบบของเชื้อรา F221-B ไม่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแตกต่างกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 93.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการใช้เชื้อ F221-B มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Horinouchi *et al.* (2011) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อรา *Fusarium equiseti* GF 191 โดยได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ พบว่าเชื้อรา GF 191 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 66.7-88.6 เปอร์เซ็นต์ และ Nahalkova *et al.* (2008) ทำการทดสอบเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ Fo47 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่ปลูกในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโพนิกส์ พบว่า Fo47 สามารถเข้าครอบครองรากของต้นมะเขือเทศทำให้พืชเกิดการชักนำให้เกิดการต้านทานโรคเหี่ยว โดย Fo47 ใช้เส้นใยเจริญอยู่ภายในเนื้อเยื่อของรากพืชทำให้เป็นการสกัดกั้นการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และได้มีการใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกันก็สามารถมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีเช่นกัน Kaur *et al.* (2003) ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* และ *Pseudomonas fluorescent* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นถั่ว ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* พบว่าเมื่อทำการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ร่วมกัน สามารถการเกิดโรคได้ 15-30 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

Treatment	% Disease incidence (DI)				% Disease severity (DS)				% Inhibition in DS over control
	7 DAI[1/]	14 DAI	21 DAI	28 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	28 DAI
Healthy control	0[2/]	0	0	0	0	0	0	0	-
Inoculated control (F422-G)	64a	100a	100a	100a	56.1a	68.3a	74.6a	93.6a	0
F221-B (CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (CF)+ F422-G	32b	32b	32b	32b	6.6b	6.6b	6.6b	6.6b	93.4
F221-B (Spore)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (Spore)+F422-G	16b	16b	16b	16b	3.3b	3.3b	3.3b	3.3b	96.7

[1/]DAI: Day after inoculation, Inoculation was made at the age of plant of 17 days.

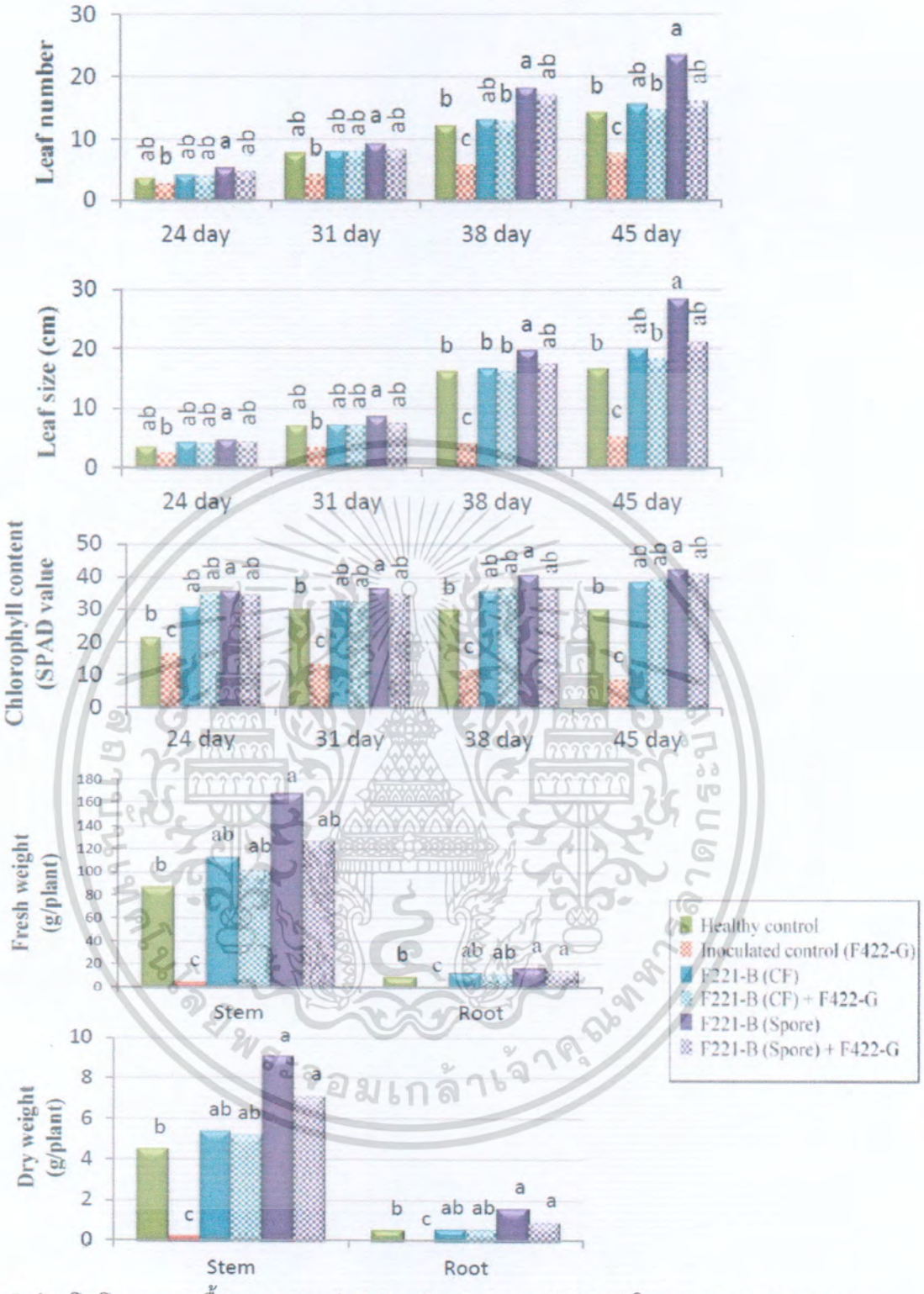
[2/]Means in a column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

การประเมินผลด้านการเจริญเติบโต

สำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่าในกรรมวิธีที่ใส่รูปแบบของเชื้อทั้ง culture filtrate และ spore suspension มีผลทำให้การเจริญของพืชทดสอบมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าในกรรมวิธีควบคุม (Healthy control)และ กรรมวิธีปลูกเชื้อ (Inoculation control) ในด้าน จำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ น้ำหนักสดต้นและราก รวมทั้งน้ำหนักแห้งต้นและราก โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ กรรมวิธีที่ใส่ spore suspension of F221-B เพียงชนิดเดียวให้ค่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดต่อต้นสูงที่สุด (167.62 กรัม/ต้น) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (86.82 กรัม/ต้น) และ กรรมวิธีปลูกเชื้อ (Inoculation) 4.25 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 3 ภาพที่ 5) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patil *et al.* (2011) ทดสอบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งความสูงและน้ำหนักของต้นมะเขือเทศ และ Horinouchi *et al.* (2011) ได้รายงานถึงการใช้เชื้อรา *Fusarium equiseti* GF 191 ที่มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อราที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Fungus: PGPF ในระบบปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในรูปแบบของสารกรอง culture filtrate และ spore suspension ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรคเหี่ยวของผักสลัด (45 วันหลังการปลูกเชื้อ).....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145222

ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในรูปแบบของสารกรอง culture filtrate และ spore suspension (45 วันหลังการปลูกเชื้อ)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการใช้เชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) เพื่อพัฒนาให้ได้ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีขึ้น จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองที่ได้จากเชื้อ F221-B โดยวิธี Agar well diffusion assay พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารกรองที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ทุกชนิด โดยระดับความเข้มข้นสูง 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่นๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบ่มเชื้อ และชนิดของเชื้อที่นำมาใช้ในการทดสอบ ส่วนในการทดสอบโดยวิธี spore germination test พบว่า ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองกับเส้นใย และจากการทดสอบประสิทธิภาพของของสารกรองที่ได้ผลดีที่สุดในการทดลองการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและสปอร์ ต่อการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* ในระบบไฮโดรโพนิกส์ พบว่าการใช้สารกรองที่ได้จากเชื้อรา F221-B สามารถควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าได้ อีกทั้งยังสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ spore suspension F221-B พบว่าสารกรองนั้นมีประสิทธิภาพน้อยกว่าเพียงเล็กน้อย ทางคณะผู้วิจัยคิดว่าเนื่องจากกลไกของเชื้อน่าจะมีมากกว่าการใช้สารกรองเพียงอย่างเดียว จึงมีผลทำให้เห็นประสิทธิภาพที่น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อมาดูถึงประสิทธิภาพโดยรวมแล้วผลที่ได้ก็ไม่แตกต่างกันจึงน่าที่จะนำเอาสารกรองไปศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อที่จะคงคุณสมบัติของเชื้อไว้ได้นานยิ่งขึ้นและประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารกรองต่อเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นรูปแบบที่ใช้งานได้ง่ายขึ้น อีกทั้งยังสามารถที่จะคงคุณสมบัติของสารเพื่อใช้ในการควบคุมโรคและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช
2. ต้องทำการทดสอบสารกรองกับโรคพืชหลายๆชนิด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนารูปแบบการนำไปใช้งานเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ธิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2555. รายงานครั้งแรกของโรคเหี่ยวในผักสลัดที่ปลูกในระบบ NFT ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* และการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับผักสลัด 4 สายพันธุ์. หน้า 71-81. *ใน* การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ธิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2556. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด ในระบบไฮโดรโพนิกส์ และลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. หน้า 46-51 *ใน* การประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6. โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท ชลบุรี.

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2548. ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และจุลินทรีย์บริเวณเขตรากพืชที่แยกได้จากสลัดที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pythium myriotylum*. *ใน* การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5. ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา ชลบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36(5-6): 1195-1198.

เสน่ห์ นิลมณี และอุดม ภูพิพัฒน์. 2547. การศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศเกิดจากเชื้อฟิวซาเรียม *Fusarium* Wilt of Tomato in Thailand. วารสารเกษตรศาสตร์ 4(4): 79-87.

Abeysinghe, S. 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Ruhuna Journal of Science 1: 24-31.

Agrios, G.N. 2005. Plant pathology 5 ed. New York : Academic Press. 992 press.

Baker, K.F. 1 9 8 7 . Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 25: 67-85.

Benhamou N, Garand C, Goulet A 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. Applied and Environmental Microbiology 68:4044-4060.

Benoit, F. 1992. Practical guide for simple soilless culture techniques. Sint-Katelijne Waver European Vegetable R&D Center. 72p.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. The Eastern London : Press Limited. 237 p.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D. 1994. Laboratory

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Burmeister, H.R., Bennett, G.A., Vesoder, R.F. and Hesseltine, C.W. 1974. Antibiotic Produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 5(6): 634-639.

Chen, D., Liu, X., Li, C., Tian, W., Shen, Q. and Shen, B. 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. Journal of Enviromental Management 137: 120-127.

Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 31: 53-80.

Correll, J.C. 1991. "The relationship between formae specialis, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*." Phytopathology 81: 1061-64.

Elmer, W.H. 2004. Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress Fusarium crown rot of asparagus in replanted fields. Plant Pathology 53(6): 751-758.

Fiddman, P.J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 74: 119-126.

Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 15: 493-502.

Horinouchi, H., Katsuyama, N., Taguchi, Y. and Hyakumachi, M. 2008. Control of Fusarium crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. Crop Protection 27: 859-864.

Horinouchi, H., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2010. Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF183. Journal of Plant Pathology 92: 251-256.

Horinouchi, H., Watanabe, H., Taguchi, Y., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2010. Biological control of Fusarium wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. Biocontrol 56: 915-923.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant disease: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S. and Naraghi, L. 2013. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. Crop Protection 53: 80-84.

Kaur, R., Kaur, J. and Singh, R.S. 2010. Nonpathogenic Fusarium as a biological control agent. Plant Pathology 9: 79-91.

Khan, A., Sutton, J.C. and Grodzinski, B. 2003. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. Biocontrol Science and Technology 13: 615-630.

Kidane, E.G. 2008. "Management of Fusarium wilt diseases using non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and silicon." Ph.D. Thesis University of Kwazulu-Ntal, Pietermaritzburg. 210 p.

Kim, H.J., Lee, E.J., Park, S.H., Lee, H. and Chung, N. 2014. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gleosporioides*) in pepper and cherry tomato by *streptomyces* sp. A1022. Journal of Agricultural Science 6: 54-62.

Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease 82: 1022-1028.

Lorito, M., Hayes, C.K., Peterbauer, C. and Harmam, G.E. 1994. Synergitic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compound enhances inhibition of spore germination. Microbiology 140: 623-629.

manual for Fusarium research. Sydney : University of Sydney. 133 pp.

Manual for Identification. U.S.A. : The Pensylvania State University Press. 193 p.

Manual for Identification. U.S.A. : The Pensylvania State University Press. 193 p.

Musavi, S.T. and Balakrishnan, R.M. 2014. A study on the antimicrobial potentials of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. Journal of Medical and Bioengineering 3(3): 162-166.

Mwaura, P.A.M., Kahangi, E., Losenge, T., Dubois, T. and Coyne, D. 2009. In vitro screening of endophytic *Fusarium oxysporum* against banana nematode (*Helicotylenchus multicinctus*). African Journal of Horticultural Science 2:103-110.

Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2008. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differ from root colonization in soil. Federation of European Microbiological Societies 286: 152-157.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006. The potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing Fusarium wilt of banana. Plant Pathology 55: 217-223.

Nelson, P. E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium species. An Illustrated

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., Haridon, F.L. and Alabouvette, C. 2005. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. Applied and Environmental Microbiology 72: 1523-1531.

Patil, S., Sriram, S. and Savitha, M.J. 2011. Evaluation of nonpathogenic *Fusarium* for antagonistic activity against Fusarium wilt of tomato. Journal of Biological Control 25: 118-123.

Ramanatha, G. and Vinodhkumar, T. 2013. Evalution of toxigenic potential of secondary metabolite from *Fusarium oxysporum*. International Journal of Science Innovations and Discoveries 3(1): 231-242.

Rodriguez, M.A., Cabrera, G. and Godeas, A. 2006. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology 100(3): 575-86.

Shamil, Z. Validov, F. Kamilova and Lugtenberg Ben J.J. 2009. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. Biological Control. 48 : 6-11.

Siddiqui, I.A. and Shaukat, S.S. 2003. Non-pathogenic *Fusarium solani* represses the biosynthesis of nematicidal compounds in vitro and reduces the biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 37: 109–114.

Silva, J.C. and Bettiol, W. 2005. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. Fitopatologia Brasileira 30: 409-412.

Song, M., Yun, H.Y. and Kim, Y.H. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginsng root rot caused by *Fusarium* cf. in carnatum. Journal of Ginseng Research 38: 136-145.

Steinkellner, S.G. and Mammeriler, R.W. 2005. Microconidia of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the preaence of root exudates. Plant Interaction 1(1): 23-30. suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology 100: 575–586.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. (ed). 1992. Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future. Plenum Press. New York. 462 p.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M. 2008. *Trichoderma* plant pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40(1): 1-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

ของ รศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

.....

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ถนิมนันต์ เจนอักษร

(ภาษาอังกฤษ) Miss Tanimnun Jaenaksorn

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520 โทรศัพท์ 02-329-8000 ต่อ 6051

ประวัติการศึกษา

การศึกษาระดับอุดมศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	2520	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วท.ม. (เกษตรศาสตร์)	2525	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
Ph.D. (Agricultural Science)	2535	Katholieke Universiteit Leuven, Belgium
Certificate (Soilless Culture)	2536	European Vegetable R&D Center, St. KatelijneWaver Belgium
Certificate (Soilless Culture)	2542	Osaka Prefecture University, Osaka, Japan
Certificate (Sustainable Agriculture)	2544	Svalov Weibul, Sweden

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

จักรพงษ์หรั่งเจริญ นงลักษณ์ เภรินทวงค์ **ถนิมนันต์ เจนอักษร** และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2551. การแยกแบคทีเรียเขตรากพืชจากผักสลัดในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเพื่อใช้ควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพ ประเทศไทย 31 ตุลาคม-2 พฤศจิกายน 2551.

ถนิมนันต์ เจนอักษร และพรประพา คงตระกูล. 2544. ศักยภาพการปลูกโหระพาฝรั่งและผักชีในระบบ Deep Flow Technique (DFT) แบบเป่าและไม่เป่าอากาศ. การประชุมวิชาการ มมส ครั้งที่ 1 วันที่ 8-9 มิถุนายน 2544 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม. หน้า 16.

ธิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2556.ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด ในระบบไฮโดรโปนิกส์ และลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6 หน้า 46-51.

ธิติ ทองคำงาม และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**.2557. การประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) การประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ประเทศไทย 28 - 30 ตุลาคม2557.

ธิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2556. การประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการของ *Trichoderma* ไอโซเลท ต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*สาเหตุโรคเหี่ยวของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า31 (3): 57-67.

มาลาตี ประดับญาติ นงลักษณ์ เภรินทวงค์ และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2557. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการสร้างสารแบบไม่ระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. สาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์. ในการประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวรครั้งที่ 12. วันที่ 28 - 29 ตุลาคม 2557 ณ คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

มาลาตี ประดับญาติ นงลักษณ์ เภรินทวงค์ และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2556. การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการของ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์.การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6 หน้า 52-57.

วีระณีย์ ทองศรี และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2544. อิทธิพลของแคลเซียมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในสภาพห้องปฏิบัติการ. การประชุมวิชาการ มมส ครั้งที่ 1 วันที่ 8-9 มิถุนายน 2544 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม. หน้า 18.

สุริยสิทธิ์ สมนึก และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2557. การประเมินคุณสมบัติของนมหมักในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช. ในรายงานการประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ประเทศไทย 28 - 30 ตุลาคม2557.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุริยสิทธิ์ สมนึก, ไพลิน เนินหาด, ทิพปภา เมฆพัฒน์ และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2558. อิทธิพลของน้ำคั้นชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L.) ต่อเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคพืชผัก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า (พิเศษ) 735-744.

สุริยสิทธิ์ สมนึก, นคร บุญน้อย และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2559. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบมะกรูด (Citrus hystrix DC.) ด้วยเอทานอลในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดต่างของข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ. ในบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 14 ณ โรงแรมเวียงอินทร์ เชียงราย 2-3 มิถุนายน 2559.

นคร บุญน้อย และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2559. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด (Citrus hystrix) ในการยับยั้งเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวในสภาพห้องปฏิบัติการ. ในบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 14 ณ โรงแรมเวียงอินทร์ เชียงราย 2-3 มิถุนายน 2559.

กรกนก สมบูรณ์พันธ์, พรประพา คงตระกูล และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2559. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลพริก ในสภาพห้องปฏิบัติการ. ในบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 14 ณ โรงแรมเวียงอินทร์ เชียงราย 2-3 มิถุนายน 2559.

ปิยาภรณ์ ทองบ้านไทร, ธิติ ทองคำงาม และ**ถนิมนันต์ เจนอักษร**. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว (*Oryza sativa* L.). ในบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 14 ณ โรงแรมเวียงอินทร์ เชียงราย 2-3 มิถุนายน 2559.

Chakrapong Rangjaroen, **Tanimnun Jaenaksorn**, Nonglak Parinthawong and Prommart Koohakan. 2009. Study on some characteristics of selected rhizosphere bacteria in hydroponics for their controlling of *Pythium* spp. Proceedings of TRF-Master Research Congress III. April 1-3, 2009, Jomtien Palm Beach Resort, Pattaya, Chonburi. P 526.

Ikeda, H., P. Koohakan and **T. Jaenaksorn**. 2002. Problems and countermeasures in the re-use of the nutrient solution in soilless production. *Acta Hort*. 578: 213-223.

Jaenaksorn T. and H. Ikeda. 2004. Possibility of substituting soilless fertilizer with soil fertilizer for growing leafy vegetables in hydroponics. Proceedings of the International Symposium on Growing Media & Hydroponics. Acta Horticulturae 644:351-357.

Jaenaksorn T. and P. Kongtragoul. 2003. Effect of crude extract of ringworm bush (*Cassia alata* L.) on the *in vitro* growth of plant pathogenic fungi found in hydroponics. The 8th International Congress of Plant Pathology, 2-7 February 2003, Christchurch, New Zealand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jaenaksorn, T. and Rachniyom. H. 2008. Effectiveness of soluble silicon and biological control agents for management of *Pythium* root rot of hydroponically-grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.). The 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008 Torino, Italy.

Jaenaksorn, T., Koohakan, P. and Prathuangwong, S. 2010. Efficacy of Indigenous *Trichoderma* and PGPR for Controlling *Pythium* Root Rot of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Deep Flow Technique. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand.

Jaenaksorn, T., Koohakan, P. and Prathuangwong, S. 2010. Test of four commercial bioproducts on *Pythium* root rot of hydroponically-grown cos lettuce (*Lactuca sativa* L.). Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand.

Jaenaksorn, T., P. Koohakan and S. Pratuangwong. 2010. Bacterial antagonists increase growth promotion and natural defense response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under hydroponics. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Parc des Expositions et des Congres de Saint-Denis, lle de la Reunion, France. June 7-11, 2010. (p 140).

Koohakan, P., **Jaenaksorn, T.** and Nuntagij, I. 2008. Major diseases of lettuce grown by commercial nutrient film technique in Thailand. KMITL Science and Technology Journal 8(2): 56-63.

Pariyaporn, T. and T **Jaenaksorn**. 2007. Antagonistic bioproduct: Survival and their effect on growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. var. *chinensis*) in deep flow technique. King Mongkut's Agricultural Journal 25(3):27-38. (in Thai)

Prommart Koohakan, Hideo Ikeda, **Tanimnun Jaenaksorn**, Motoaki Tojo, Shin-IchiKusakari, Kiyotsugu Okada and Suguru Sato. 2004. Evaluation of the Indigenous Microorganisms in Soilless Culture: Occurrence and Quantitative Characteristics in the Different Growing Systems. Scientia Horticulturae 101:179-188.

Prommart Koohakan, Hideo Ikeda, **Tanimnun Jaenaksorn**, Motoaki Tojo, and Shin-IchiKusakari. 2002. Effects of Inorganic Elements on the *In-vitro* Growth of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Microbes and Environments 17(2):91-97.

Rachniyom, H. and **Jaenaksorn T.** 2008. Effect of soluble silicon and *Trichoderma harzianum* on the in vitro growth of *Pythium aphanidermatum*. Agricultural Technology 4 (2): 57-71.

Rachniyom, H. and **T. Jaenaksorn**, 2007. Formulation of antagonistic bio-product: Survival, potential and their effect on growth of kale (*Brassica oleracea* L. var.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acephala DC.) in deep flow technique. Proceedings of The 8th National Plant Protection Conference 157-171. (in Thai)

Talubnak, C., Parinthawong, N. and **Jaenaksorn, T.** 2014. In-vitro screening for non-pathogenic isolates of *Pythium* spp. from asymptomatic and symptomatic lettuce in hydroponic. In: The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, 11-13 December 2014 at KMITL chumphon campus, chumphon Thailand.

Talubnak, C., Koohakan, P., Parinthawong, N. and **Jaenaksorn, T.** 2010. Effect of the indigenous non-pathogenic *Pythium* spp. on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponics. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand.

Tanimnun Jaenaksorn and Pornprapa Kongtragoul. 2004. Growing Potential of Two Varieties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Deep Flow Technique for Leaf and Seed Production. Proceedings of the First KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, August 25-26, 2004, Bangkok, Thailand. Vol 2: 108-111.

Tanimnun Jaenaksorn and Warangkana Nokyoo. 2002. Effect of Root and Foliar Applications of Silicon on Growth and Quality of Five-Selected Vegetables in Deep Flow Technique. The Second Silicon in Agriculture Conference, August 22-26, 2002, Tsuruoka, Japan. p. 228-239.

Taprap, R., Laisuwan, S. and **Jeanaksorn, T.** 2010. Respiration rate and quality change of Minimally processed spiny coriander (*Eryngium foetidum* Linn) and water mimosa (*Neptuni aoleracea* Lour) as affected by packaging and low temperature storage. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, Bangkok, Thailand.

Taprap, R., **T. Jaenaksorn**, M. Soonwera, K. Anusitwiwat and P. Loetphanit. 2004. Physical and Chemical Properties of *Garciniacowa* Roxb, *Garciniaschom burgkiana* Pierre and *Garciniadulcis* Kurz. Proceedings of the First KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development, August 25-26, 2004, Bangkok, Thailand. Vol 2: 126-128.

Somnuek S., Kongtragoul P. and **Jaenaksorn T.** 2015. Assessment of the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. from five different habitats on plant pathogenic fungi. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Thongkamngam T. and **Jaenaksorn T.** 2015. Colonization of plant root and punctured surface tissue by non-pathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum*. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Talubnak C., Parinthawong N. and **Jaenaksorn T.** 2015. *In vitro* production of cell wall degrading enzymes by *Pythium* species isolated from asymptomatic and symptomatic lettuce root. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Pradubyat M., Parinthawong N. and **Jaenaksorn T.** 2015. Gene expression analysis in lettuce (*Lactuca sativa* L.) treated with *Trichoderma* spp. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Thongkamngam T. and **Jaenaksorn T.** 2015. Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Jaikengkaj K., **Jaenaksorn T.** and Koohakan P. Comparison of *Trichoderma* population in the re-circulating nutrient solution with and without supporting material in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Somnuek S., Kongtragoul P. and **Jaenaksorn T.** 2015. Morphological identification of *Trichoderma* species from different habitats. in Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Thongkamngam, T. and **Jaenaksorn, T.** 2016. Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi in vitro and *Fusarium* root rot and wilt disease in hydroponics. Journal of Agricultural Technology 12(3): 513-526.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thongkamnkam, T. and Jaenaksorn, T. (2016). Efficacy of culture filtrate produced by *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in hydroponics*. Journal of Agricultural Technology 12(3): 609-622.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Journal of Agricultural Technology 2016Vol. 12(3): 609-622
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and Fusarium root rot and wilt disease in hydroponics

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. (2016). Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and Fusarium root rot and wilt disease in hydroponics. Journal of Agricultural Technology 12(3):609-622.

The purpose of this research was to evaluate the potential of culture filtrate (CF) of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) against 10 plant pathogenic fungi namely, *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) and *R. solani* (R11, R12) *in vitro* and *Fusarium* root rot disease in hydroponics. *In vitro* antifungal activity analysis indicated that all test concentrations of F221-B culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth of all tested fungal pathogens less than 39 % over control. Interestingly, the CF at all test concentrations revealed the greatest spore germination inhibition 100% over control against F113, F221-R and F422-G whereas spore germinations of C11 and C12 were completely inhibited by the CF at the concentrations of 60, 80 and 100%. In addition, spore abnormalities such as swelling and lysis were noted. Regard to antifungal analysis in hydroponics, the most striking and remarkable result was obtained. The non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce more than 90% and producing significantly better growth than that in non-treated lettuces. Moreover, no significant degree of difference in terms of lettuce growth was noted between using culture filtrate and spore suspension of F221-B.

Keywords: culture filtrate, non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*

Introduction

Biological control of plant diseases including fungal pathogens has been considered as environmentally safe and viable alternative measure to chemical control (Baker, 1987; Cook, 1993; Tjamos *et al*., 1992). Non-pathogenic species of the fungal genus *Fusarium* were numerously reported to successfully control Fusarium wilt of various crops worldwide (Elmer, 2004; Larkin and Fravel, 1998 and 2002; Nel *et al*., 2006; Silva and Bettiol, 2005). In Thailand, non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), originally isolated from root of lettuce grown in hydroponics, has shown its ability as plant growth promoting fungus (PGPF) on various crops such as

*Coressponding Author: Jaenaksorn, T; E-mail: tanimnun@gmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Butterhead, Cos, Green oak, Red oak lettuces, kale and mung bean (Thongkamngam *et al.*, 2013; Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a) and as biocontrol agent (BCA) against plant pathogenic fungi, namely *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp. and *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a). Non-pathogenic F221-B showed remarkable consistency in retaining its morphology characteristics and its efficacy as BCA and PGPF during 24 months storage (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a). In addition, F221-B was proved to be able to colonize on root surface (epiphyte) as well as inside the root of lettuce (endophyte) without producing any disease symptoms (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015b).

Fusarium root rot and wilt disease was regarded as one of the most seriously disease of lettuce grown in soil and hydroponic cultivation (Cabral *et al.*, 2014; Chinta *et al.*, 2014; Malbran and Mourelos, 2014; Scott *et al.*, 2014; Thongkamngam *et al.*, 2012). The disease was caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Effective control methods against this disease are limited whereas chemical control has adverse effect to the consumer and environment. On this regard, non-pathogenic F221-B would be one of the strong candidates as biological control agent to solve this problem. Based on the above-mentioned good characteristics of F221-B as PGPR and BCA from which the feature of antibiosis was also observed in confrontation experiment between F221-B and test fungal pathogens at the early stage of incubation period (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a), it is interesting to further research on the antifungal ability of secondary metabolites in culture filtrate of non-pathogenic F221-B.

Therefore, the research was conducted to determine the potential of culture filtrate (CF) of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) against 10 plant pathogenic fungi namely, *Curvularia* sp. (C11, C12), F. semitectum (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* sp. (R11, R12, R13) and *R. solani* (R11, R12) *in vitro* and Fusarium root rot disease in hydroponics.

Materials and methods

Fungal isolation

The test fungal pathogens were isolated from naturally infected disease plants i.e. *Curvularia* spp. (C11, C12) and *F. semitectum* (F113) from rice seeds showing dirty panicle disease, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) from root of lettuce grown in hydroponics showing root rot disease, *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) from rice leaf shealth showing blight disease and *R. solani* (R11, R12) from rice seedling, by tissue transplanting technique on water agar. The fungi were purified and maintained on potato dextrose agar (PDA) and stored at 4°C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Non-pathogenic *Fusarium* F221-B was obtained from the previous research of Thongkamngam *et al.* (2013).

Preparation of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F221-B)

Regard to our research aiming at assessment for antifungal activity of secondary metabolites in culture filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), only the complete cell-free culture filtrate has to be used in the experiment. Therefore, two types of preparation for obtaining the cell-free culture filtrate were carried out for this regard: i) using micro-filter (Minisart®; Sartorius stedim biotech, 0.2 µm) and ii) using moist-heat from autoclave.

To obtain filtrates of the fungal culture, 5 mycelial agar plugs (0.5 cm in diameter) of F221-B were inoculated into 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of potato dextrose broth (PDB) and the culture was incubated at room temperature. After 7 days, the biomass was separated from the broth, which contained the fungal metabolites, by filtering through Whatman filter paper no.1 before being centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. Then, the filtrates were undergone through the process of getting the complete cell-free CF by 2 types of preparation procedure mentioned-above. After that, the obtained cell-free CF was diluted with sterile distilled water to give concentrations of 20, 40, 60 and 80 % ready to be used.

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) against plant pathogenic fungi by agar well diffusion assay

To determine the antifungal activity of F221-B culture filtrate at different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100%) on mycelial growth of 10 plant pathogenic fungi, the experiment was conducted in duplicate; i) employing cell-free CF prepared by using micro-filter and ii) employing cell-free CF prepared by using moist heat of autoclave. Randomized Completely Block Design (RCBD) with 3 replications was employed.

Ten plant pathogenic fungi (C11, C12, F113, F221-R, F422-G, R11, R12, R111, R112, and R113) were cultured on PDA plate and incubated for 3 days. Then, 6 holes of 5 mm in diameter were punched with sterile cork borer aseptically into the agar outside the periphery of pathogen colony. 30 µl of each concentration of F221-B culture filtrate was introduced into each bored agar well. All plates were incubated at room temperature. The radial growths of tested pathogens were daily measured and the percentage of growth inhibition of tested pathogens was calculated.

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) on spore germination of plant pathogenic fungi

To investigate the inhibitory effect of F221-B culture filtrates at different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100%) on spore germination of 5 fungal plant pathogens, namely C11, C12, F113, F221-R and F422-G,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the experiment was performed in duplicate; i) employing cell-free CF prepared by using micro-filter and ii) employing cell-free CF prepared by using moist heat of autoclave. Completely randomized design with 2 replications was employed. 30 µl of the fungal spores (1×10^6 spore/ml) were placed onto concave glass slides in the presence of 30 µl of culture filtrates (concentration of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 percent) and incubated in the moist chamber in the dark at room temperature (25±2°C). After 12, 24 and 48 h, the percentage of spore germination of fungal spores was determined by light microscopy. In addition, the occurrence of spore abnormalities was monitored.

Effect of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) for controlling root rot of lettuce in hydroponics

Antifungal activity of F221-B culture filtrate was further determined for controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce grown in hydroponics. The concentration of F221-B culture filtrate to be used in hydroponic experiment was selected from the agar well diffusion assay and spore germination test from which showing high potential of antifungal activity. The experiment was conducted using completely randomized design of 6 treatments with 3 replications and 3 plants per replication. Treatments comprised of:

Treatment 1: Healthy Control (Non-inoculated control)
Treatment 2: Inoculated control (with pathogen F422-G)
Treatment 3: Culture filtrate of F221-B
Treatment 4: Culture filtrate of F221-B + F422-G
Treatment 5: Spore suspension of F221-B
Treatment 6: Spore suspension of F221-B + F422-G

Seeds of Cos lettuce were sown in moistened sponge in seed tray and watered with tap water for a week and then moved into mini DFT system and fertilized with nutrient solution (EC=1 ms/cm2, pH=5.8-6.2). After 2 weeks, 3 seedlings were transplanted into a rectangular plastic container (25×34×15 cm) containing 5 liters of nutrient solution (EC=1.6 ms/cm^2, pH=5.8-6.2).

At 14 days, lettuces were treated with non-pathogenic F221-B by immersing their root into either culture filtrate or spore suspension of F221-B (5 ml/plant) for 5 minutes and the rest of F221-B was poured back into the growing container. Sterile water was used for control. Three days later, pathogen inoculation was made by pouring 15 ml of spore suspension (10^6 spores/ml) of F422-G into a growing container. Sterile water was used for control.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Data collection and analysis

Disease index was rated up to 6 levels (0: healthy root, 1: reddish brown root, 2: reddish brown root and became rotten, 3: rotten root, with slight wilting, 4: rotten root with severe wilting, 5: plant became dead).

Disease incidence (DI) and disease severity (DS) of tested plant were calculated by equation 1 and 2, respectively.

$$\% \text{ DI} = \frac{\text{(Number of plants showing infected root)}}{\text{Number of total plants}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ DS} = \frac{\sum \text{(Number of plants showing infected root} \times \text{disease index)}}{\text{Number of total plants} \times \text{the highest disease index}} \times 100 \quad (2)$$

DI, DS, as well as plant growth parameters such as leaf number, leaf size, chlorophyll content (SPAD value) on the leaf were weekly monitored after inoculation whereas fresh and dry weight of shoot and root were recorded at the end of trial.

All collected data were statistically analysed by analysis of variance. Treatment means were separated using Duncan's multiple range tests.

Results and Discussion

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) against 10 plant pathogenic fungi by agar well diffusion assay

Culture filtrate of F221-B was checked for its effect against mycelial growth of 10 fungal plant pathogens by using agar well diffusion assay. Among 2 types of CF of F221-B, the results revealed that cell-free culture filtrate prepared by using either micro-filter or moist-heat from autoclave still showed the similar level of antifungal activity against all tested fungi except for R11 and R112 (Fig. 1). This indicated the thermo-stable nature of these antifungal metabolites in culture filtrate produced by F221-B. Surprisingly, autoclaved CF gave higher inhibition against R11 and R112 than those from non-autoclaved CF.

Results shown in Fig. 1 revealed that the cell-free culture filtrate of F221-B contained secondary metabolites such as some bioactive compounds that inhibited the *in vitro* fungal pathogen growth whereas this inhibitory effect varied depending on the concentrations of CF tested. F221-B culture filtrate at all tested concentrations exhibited slight inhibitory effect against mycelial growth of all tested fungal pathogens in the range of 6-39 percent over the untreated control. Overall, among the tested concentrations, culture filtrates at 80 and 100 % gave the significant highest inhibition. *Curvularia* spp. (C11 and C12) were shown to be most sensitive to F221-B culture filtrate.

The inhibitory effect of F221-B culture filtrate was in accordance with those of Benhamou *et al.* (2002); Halmann and Sikora, (1994); and Khurshid *et al.* (2014) who reported that various non-pathogenic *Fusarium* isolates have shown their ability to suppress plant pathogens. Tayung *et al.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2010) reported that the metabolite produced by endophytic *Fusarium* (MTCC-9622) showed significant antifungal activity against 3 postharvest pathogens including *F. oxysporum*.

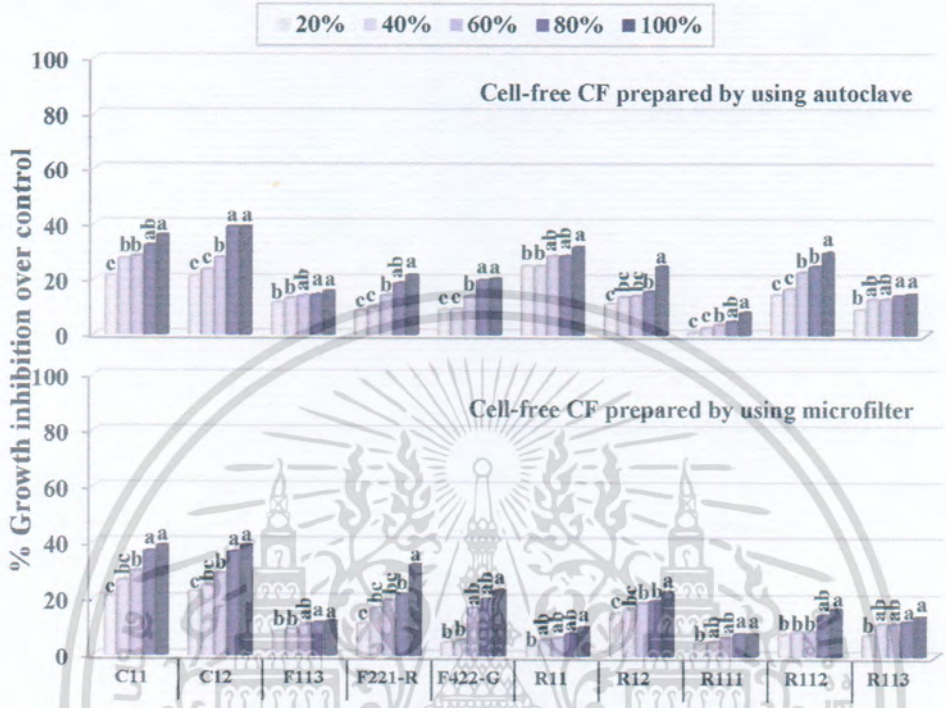


Fig. 1 Effect of cell-free culture filtrate produced by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B against mycelial growth of 10 plant pathogens by agar well diffusion assay. (C11, C12: *Curvularia* spp.; F113: *F. semitectum*; F221-R and F422-G: *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*; R11 and R12: *R. solani*, R111, R112 and R113: *Rhizoctonia* spp.)

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F221-B) on spore germination of 5 plant pathogenic fungi

Culture filtrate of F221-B was tested for its antifungal activity on spore germination of 5 fungal plant pathogens. The result was in line with the afore-mentioned experiment using agar well diffusion method that CF of F221-B prepared using either micro-filter or moist-heat from autoclave resulted in the same level of antifungal activity against the germination of test fungi (Fig. 2). This reconfirmed once again that the toxic metabolites in culture filtrate produced by F221-B are having thermo-stable nature.

A significant inhibitory effect (100 % inhibition over control) of all test concentrations (20, 40, 60, 80 and 100%) of cell-free culture filtrate of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F221-B on germination of spores of *F. semitectum* (F113) and *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) was evident throughout the experiment (12-48 h) (Fig. 2). However, for the case of *Curvularia* spp. (C11 and C12), significant antifungal activity (100 % inhibition over control) of the CF of F221-B was observed only at the concentration of 60, 80 and 100 %. In addition, the level of inhibition of germination of their spores added to F221-B cell-free CF at the low concentration of 20 and 40 % declined with increasing time (Fig. 2). This decline could be held responsible for the decreasing levels of volatile sporostatic factors produced by F221-B. As soon as the appearance of volatile compound was ended, a persistent level of inhibition of spore germination caused by a stable inhibitor from non-volatile compound was shown. Furthermore, abnormalities of spores were detected such as swelling, lysis (Fig. 3).

In the current study, we observed the significantly higher degree of inhibitory activity of F221-B culture filtrates against spore germination of all tested fungi than those of their mycelial growth. This may be attributed to the direct exposure of spore to the culture filtrate.

Findings from *in vitro* experiments concerning the inhibitory effects of culture filtrates of F221-B are in agreement with several previous works by Aydi-Ben Abdallah *et al.* (2014); Lemanceau *et al.* (1993); Sonawane *et al.* (2015). In addition, the filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* was reported to counteract the growth of *Staphylococcus aureus* causing dermatological disease (Ahmed Sheikh, 2010).

On the basis of our findings from *in vitro* studies, it is assumed that the culture filtrate of F221-B tested may also contain antibiotics, toxins and/ or enzymes against the test fungal plant pathogens. Although the antifungal metabolites in culture filtrate produced by F221-B have not been so far identified chemically, it is still noteworthy that thermo-stability of such metabolites has been observed from our *in vitro* experiments. Additional studies are required to identify the active antifungal compound in F221-B culture filtrate.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

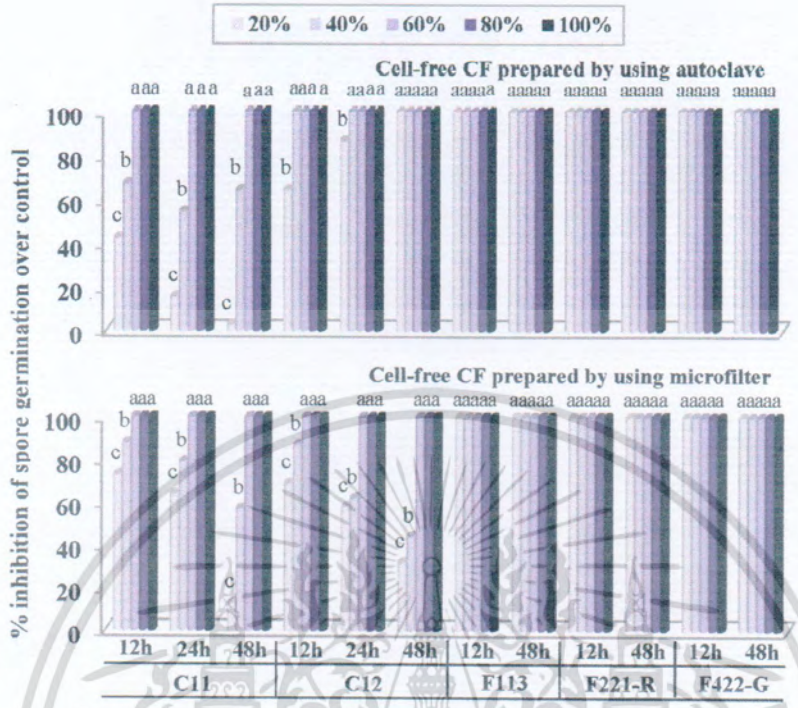


Fig. 2 Effect cell-free culture filtrate produced by non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B at different concentrations (20, 40, 60, 80 and 100 percent) against spore germination of 5 plant pathogenic fungi (3 days after inoculation).

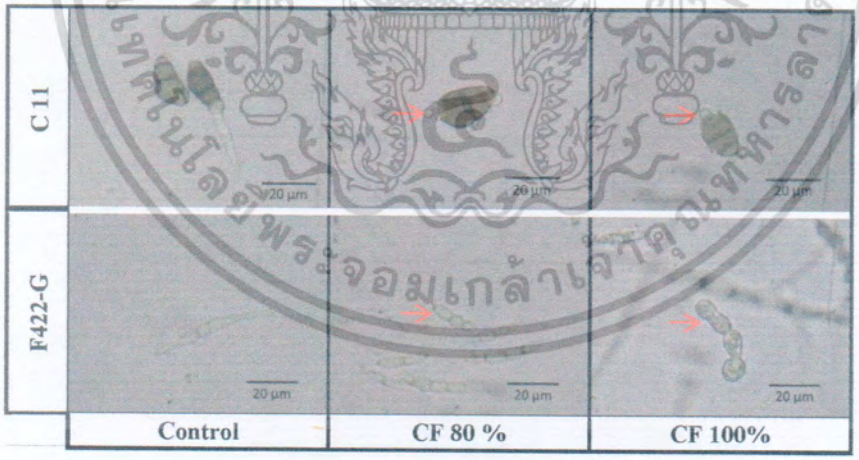


Fig. 3 Abnormal spores of *Curvularia* sp. (C11) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) occurred in culture filtrate of non-pathogenic F221-B at the concentration of 80 and 100 percent, at 48 h.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) for controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce in hydroponics

The experiment was conducted to investigate the effect of culture filtrate of non-pathogenic F221-B in controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce in hydroponics. The result showed that lettuce from non-inoculated (healthy) control grew and developed normally while lettuce treated only with F221-B (culture filtrate or spore suspension) did not show any disease symptoms throughout the trial (Table 1) and grew significantly better than that of non-inoculated control (Fig. 4).

At 7 days after inoculation (DAI), the inoculated lettuce with F422-G began to show symptoms of root rot with 64 % disease incidence (DI) and 56.1 % disease severity (DS) whereas the lettuce treated with culture filtrate and spore suspension of non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) prior to pathogen inoculation showed significant low percentage in DI and DS about 32, 16 and 6.6, 3.3 percent, respectively. Regard to inoculated control, percentage of DI and DS increased with increasing incubation time; lettuces showed severe symptoms of root rot and wilt with 100% DI at 14 DAI and DS reached highest of 93.6% at 28 DAI. At 28 DAI, pre-treatment with either culture filtrate or spore suspension of F221-B exhibited a significant inhibition over control of more than 90 % in DS (Table 1).

In terms of plant growth, the most pronounced and statistically significant reduction in all the growth parameters such as leaf number, leaf size and SPAD value was recorded only in lettuces in inoculated control throughout the trial (Fig. 4) while the treatments with F221-B (either CF or spore) prior to pathogen (F422-G) inoculation resulted in the same normal growth as that in non-inoculated control (healthy control) and in F221-B treated lettuce. For overall, non-pathogenic F221-B-treated lettuces showed a more vigorous root system without apparent of root rot symptom and finally resulted in significantly much better growth (fresh weight of stem and root) than that in non-treated lettuces. In addition, spore of F221-B tended to be more efficient than the culture filtrate since the fresh weight and dry weight of stem and root of lettuce treated with spore of F221-B was shown to be significantly greater than that in non-inoculated control (Fig. 4).

Based on our results, non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce and producing greater growth with no significant degree of difference between using culture filtrate or spore suspension of F221-B. These results are agreed with earlier reports of their success in using non-pathogenic *F. oxysporum* to control Fusarium wilt of various vegetables (Reddy, 2013) such as asparagus (Elmer, 2004), basil (Minuto *et al.*, 1997 and Larkin and Fravel, 2002), cucumber (Mandeel and Baker, 1991; Paulitz *et al.*, 1987), pea (Benhamou and Garand, 2001), radish (Toyota *et al.*, 1995), spinach (Katsube and Alaska, 1997), sweet potato (Ogawa and Komada, 1984) and tomato (Larkin and Fravel, 1996 and Silva and Bettiol,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2005). In addition, our result is similar to that of Horinouchi *et al.* (2010), who reported that Fusarium wilt of spinach was effectively controlled by PGPF *F. equiseti* GF183.

These results provide evidence of the antagonistic activity of F221-B in controlling root rot disease caused by *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) and promoting the overall growth in lettuce.

Table 1 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) in controlling root rot of lettuce grown in hydroponics.

Treatment	% Disease incidence (DI)				% Disease severity (DS)				% Inhibition in DS over control
	7 DAI[1/]	14 DAI	21 DAI	28 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	28 DAI
Healthy control	0[2/]	0	0	0	0	0	0	0	-
Inoculated control (F422-G)	64a	100a	100a	100a	56.1a	68.3a	74.6a	93.6a	0
F221-B (CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (CF)+ F422-G	32b	32b	32b	32b	6.6b	6.6b	6.6b	6.6b	93.4
F221-B (Spore)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (Spore)+F422-G	16b	16b	16b	16b	3.3b	3.3b	3.3b	3.3b	96.7

[1/]DAI: Day after inoculation, Inoculation was made at the age of plant of 17 days.
[2/]Means in a column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

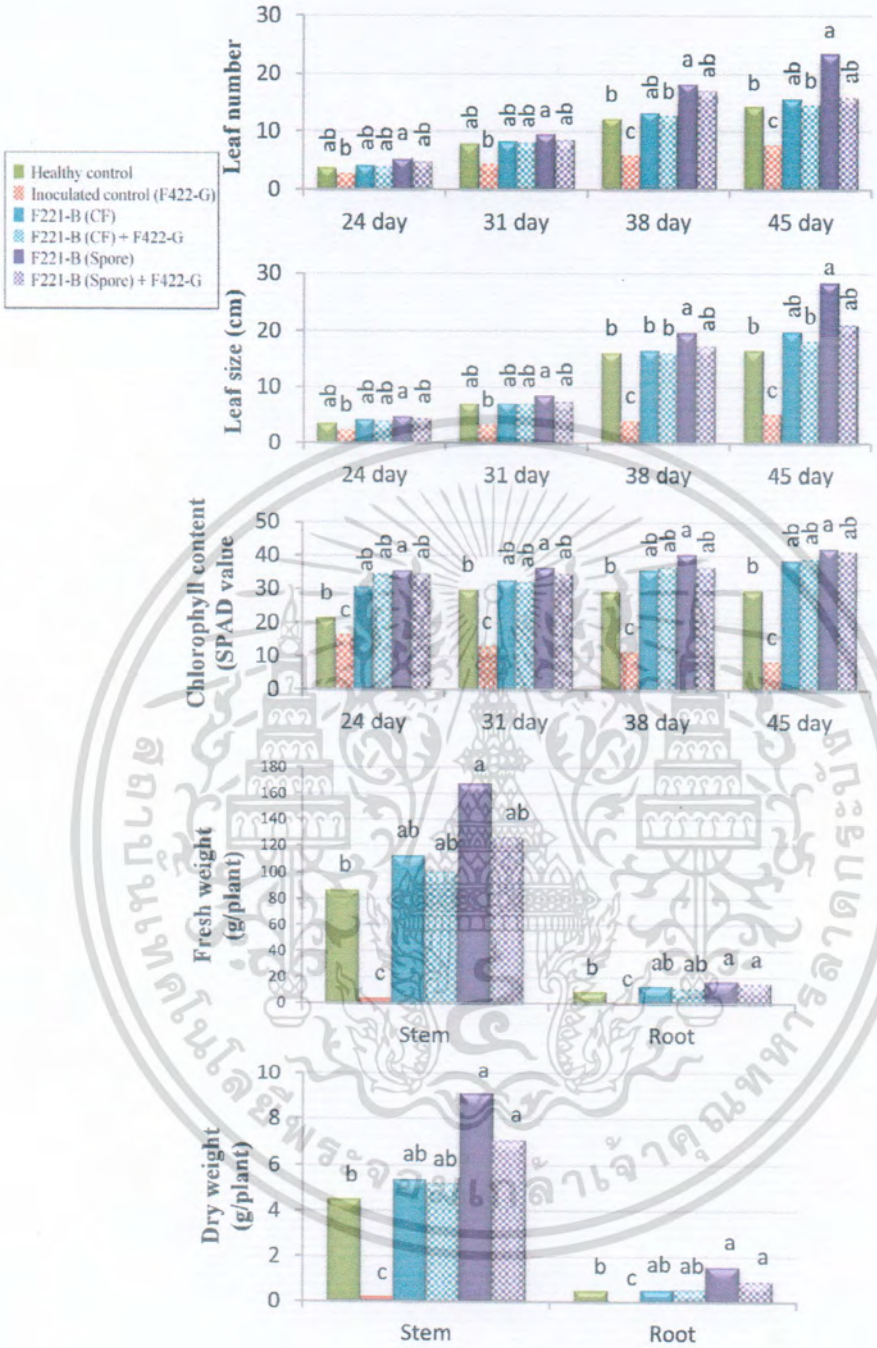


Fig. 4 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) on growth of lettuce in hydroponics.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 5 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B (culture filtrate and spore suspension) for controlling root rot disease of lettuce grown in hydroponics (45 days after inoculation).

Conclusion

In this research, the potential of cell-free culture filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) was evaluated against 10 plant pathogenic fungi. Among 2 types of cell-free culture filtrate used, autoclaved CF for overall still exhibited the same level of antifungal activity against test fungi as those from non-autoclaved CF (using micro-filter). This should be noted that thermo-stability of antifungal metabolites in culture filtrate of F221-B has been observed from our *in vitro* experiments. For agar well diffusion assay, all test concentrations of culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth (about 6-39 percent over control) of all tested fungal pathogens while the promising fungitoxic effect was recorded only at the concentrations of 80 and 100 percent of CF. Similar but more promising results were obtained from the spore germination test. F221-B culture filtrate at all test concentrations showed excellent spore germination inhibition 100 % over control against F113, F221-R and F422-G whereas only at 60, 80 and 100 % of F221-B culture filtrate were shown to completely inhibit the spore germination of C11 and C12.

Taken together, non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B in the form of either culture filtrate or spore suspension was significantly efficient in controlling root rot disease of lettuce. In addition, it significantly exhibited beneficial effect on overall growth of lettuce.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand in year 2016 (grant number 2559-01-04-02).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reference

Ahmed Sheikh H.M. 2010. Antimicrobial activity of certain bacteria and fungi isolated from soil mixed with human saliva against pathogenic microbes causing dermatological diseases. Saudi Journal of Biological Sciences 17(4): 331-339.

Aydi-Ben Abdallah, R., Hassine, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Haouala, R. and Daami-Remadi, M. 2014. Antifungal activity of culture filtrates and organic extracts of *Aspergillus* spp. against *Pythium ultimum*. Tunisian Journal of Plant Protection 9: 17-30.

Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 25: 67-85.

Benhamou, N. and Garand, C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. Phytopathology 91(8): 730-740.

Benhamou, N., Garand, C., and Goulet, A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. Applied and Environmental Microbiology 68(8): 4044–4060.

Cabral, C.S., Brunelli, K.R., Costa, H., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S. and Reis, A. 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. Tropical Plant Pathology 39(3): 197-202.

Chinta, Y.D., Kano, K., Widiastuti, A., Fukahori, M., Kawasaki, S., Eguchi, Y., Misu, H., Odani, H., Zhou, S., Narisawa,K., Fjiwara, K., Shinohara, M. and Sato, T. 2014. Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) in hydroponic cultures. Journal of the Science of Food and Agriculture 94(11): 2317-2323.

Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 31: 53-80.

Elmer, W.H. 2004. Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress Fusarium crown rot of asparagus in replanted fields. Plant Pathology 53(6): 751-758.

Hallmann, J. and R. A. Sikora. 1994. Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of Fusarium in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergists for biological control of root knot nematodes. International Journal of Pest Management 40:321-325.

Horinouchi, H., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2010. Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF 183. Journal of Plant Pathology 92(1): 249-254.

Katsube, K. and Alaska, Y. 1997. Control of Fusarium wilt of spinach by transplanting seedlings pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 63: 389-394.

Khurshid, S., Shoaib, A. and Javaid, A. 2014. In vitro toxicity evaluation of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on growth and physiology of tomato under chromium (VI) stress. The Journal of Animal & Plant Sciences 24(4): 1241-1245.

Larkin, R. P., and Fravel, D. R. 1996. Efficacy of various biocontrol organisms in the control of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology 86:83-86.

Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease 82: 1022-1028.

Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 2002. Reduction of Fusarium wilt of hydroponically-grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. Crop Protection 21: 539-543.

Lemanceau, P., Baker, P.A.H.M., De Kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B.1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. Applied Environmental Microbiology 59:74-82.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Malbran, I. and Mourelos, C.A. 2014. Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Argentina. Plant Disease 98(9): 1281-1281.

Mandeel, Q. and Baker, R. 1991. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81: 462-468.

Minuto, A., Minuto, G., Migheli, Q., Mocioni, M. and Gullino, M.L. 1997. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). Crop Protection 16: 765-769.

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006. The potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing Fusarium wilt of banana. Plant Pathology 55: 217-223.

Ogawa, K. and Komada, H. 1984. Biological control of Fusarium wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Annals of the Phytopathology Society of Japan 50: 1-9.

Paulitz, T.Z., Park, S. and Baker, B. 1987. Biological control of Fusarium wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology 33: 349-353.

Reddy, P.P. 2013. Recent Advances in Crop Protection. Springer, London. 268p.

Scott, J.C., Mcroberts, D.N. and Gordon, T.R. 2014. Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, the cause of Fusarium wilt of lettuce. Plant Pathology 63: 548-553.

Silva, J.C. and Bettiol, W. 2005. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolation for control of Fusarium wilt of tomato. Fitopathologia Brasileira 30: 409-412.

Sonawane, A., Mahajan, M. and Renake, S. 2015. Antifungal activity of a fungal isolates against Pomegranate wilt pathogen *Fusarium*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2: 48-57.

Tayung, K., Barik, B.P. and Jha, D.K. 2010. Antifungal activity and biocontrol potential of metabolite produced by an endophytic Fusarium (MTCC-9622) against some postharvest pathogens. Journal of Agricultural Technology 6(3): 409-419.

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015a. Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation. In 2nd International Symposium on Agricultural Technology (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 173-176.

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015b. Colonization of plant root and punctured surface tissue by non-pathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum*. In 2nd International Symposium on Agricultural Technology (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 157-160.

Thongkamngan, T., Koohakan, P. and Jaenaksorn, T. 2012. First report of Fusarium wilt of NFT-grown lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Thailand and its pathogenicity on four varieties of lettuce. In: 10th Naresuan Conference, Phitsanulok, Thailand. 72-81. (In Thai)

Thongkamngan, T., Koohakan, P. and Jaenaksorn, T. 2013. *Fusarium oxysporum* F221-B as plant growth-promoting fungus (PGPF) on six plants in hydroponics and its growth characteristics on different media. In: 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference, Chonburi, Thailand. 46-51. (In Thai)

Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. (ed). 1992. Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future. Plenum Press. New York. 462 p.

Toyota, K., Kitamura, M. and Kimura, M. 1995. Suppression of *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* PEG-4 in soil following colonization by other *Fusarium* spp. Soil Biology Biochemistry 27(1): 41-46.

(Received: 31 March 2016, accepted: 16 April 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้